

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004年3月18日 (18.03.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/022742 A1(51) 国際特許分類⁷: C12N 15/09, C12Q 1/02, C12N 1/19

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/011329

(22) 国際出願日: 2003年9月5日 (05.09.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-260515 2002年9月5日 (05.09.2002) JP
特願2002-280512 2002年9月26日 (26.09.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社生物技術研究所 (BIOCHEMICAL AND PHARMACOLOGICAL LABORATORIES INC.) [JP/JP]; 〒584-0023 大阪府 富田林市 若松町東一丁目9番32号 Osaka (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 勝山 巖 (KATSUYAMA, Iwao) [JP/JP]; 〒584-0023 大阪府 富田林市 若松町東一丁目9番32号 株式会社生物技術研究所内 Osaka (JP). 荒川 力 (ARAKAWA, Tsutomu) [JP/US]; 93012 カリフォルニア州 カマリロ, ワン・ユニバーシティ・ドライブ, カリフォルニア州立大学・チャネル・アイランズ, S&Tビルディングアライアンス・プロテイン・ラボラトリーズ内 CA (US). 徳永 正雄 (TOKUNAGA, Masao) [JP/JP]; 〒890-0065 鹿児島県 鹿児島市 郡元一丁目21番24号 鹿児島大学農学

部内 Kagoshima (JP). 山本 雅 (YAMAMOTO, Tadashi) [JP/JP]; 〒108-0071 東京都 港区 白金台四丁目6番1号 東京大学医科学研究所内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 細田 芳徳 (HOSODA, Yoshinori); 〒540-6591 大阪府 大阪市 中央区 大手前一丁目7番31号 OMMビル5階 私書箱26号 細田国際特許事務所内 Osaka (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF SCREENING PHYSIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCE

(54) 発明の名称: 生理活性物質のスクリーニング方法

(57) Abstract: A method of screening a physiologically active substance which comprises (1) the step of contacting a transformed yeast, which can express a foreign protein and shows a change in the growth state under the expression of this protein compared to the case without the expression thereof, with a test sample, (2) the step of culturing the yeast under the conditions allowing the expression of the protein, and (3) the step of measuring the growth state of the yeast, and in which the test sample is judged as containing a physiologically active substance in the case where the growth of the yeast is lessened or elevated in the presence of the test sample compared to a control case having no test sample; a yeast to be used in the above method; a physiologically active substance which can be obtained by the screening method; and a kit for screening a physiologically active substance which contains the above yeast.

(57) 要約: 本発明は、(1)異種タンパク質を発現可能であり、かつ該タンパク質の非発現下と比べて発現下に生育状態の変化が認められる形質転換酵母と被験試料とを接触させる工程、(2)該タンパク質を発現する条件下に該酵母を培養する工程、ならびに(3)該酵母の生育状態を測定する工程を含み、被験試料の非存在下を対照として被験試料の存在下に該酵母の生育が低下もしくは向上する場合に被験試料中に生理活性物質が存在すると判定する、生理活性物質のスクリーニング方法、当該方法に使用される酵母、該スクリーニング方法により得られうる生理活性物質、ならびに該酵母を含んでなる生理活性物質のスクリーニング用キットに関する。

WO 2004/022742 A1

明 細 書

生理活性物質のスクリーニング方法

技術分野

本発明は、細胞の増殖や分化に作用しうる生理活性物質のスクリーニング方法に関する。

背景技術

これまでに細胞周期調節に関与する種々の因子が報告され、その機能が徐々に明らかにされつつある。たとえば、Tob ファミリーという一群のタンパク質が知られており、該タンパク質をコードする遺伝子として、現在までに6種類のメンバーが哺乳類で見出されている（たとえば、吉田富，山本雅(2001)実験医学, 19, 1194-1198 参照）。たとえば、Tob を培養細胞に強制発現させると細胞増殖抑制を示すことが報告されている（たとえば、Suzuki, T., K-Tsuzuku, J., Ajima, R., Nakamura, T., Yoshida, Y., and Yamamoto, T., (2002) Genes Dev., 16, 1356-1370 参照）。この細胞増殖抑制の正確な分子メカニズムは不明であるが、Tob は細胞周期の G0/G1 期停止および G2/M 期停止の両方に関与しているものと考えられ、該タンパク質は転写因子のコファクターとして機能することが示唆されている。また、*tob* 遺伝子欠損マウスでは骨量が増加することが知られている（たとえば、Yoshida, Y., Tanaka, S., Umemori, H., Minowa, O., Usui, M., Ikematsu, N., Hosoda, E., Imamura, T., Kuno, J., Yamashita, T., Miyazono, K., Noda, M., Noda, T., and Yamamoto, T. (2000) Cell, 103, 1085-1097 参照）。Tob は、細胞内シグナル伝達分子である Smad に結合して骨形成因子(BMP)シグナルを抑制し、BMP 依存的な骨芽細胞の増殖および分化を抑制して骨形成を制御していることが明らかにされている（たとえば、Yoshida, Y., Tanaka, S., Umemori, H., Minowa,

O., Usui, M., Ikematsu, N., Hosoda, E., Imamura, T., Kuno, J., Yamashita, T., Miyazono, K., Noda, M., Noda, T., and Yamamoto, T. (2000) *Cell*, 103, 1085-1097 参照)。

また、Caf ファミリーという一群のタンパク質が知られている。このタンパク質は酵母を含むすべての真核生物に存在する。たとえば、Caf1 は CCR (carbon catabolite repressor) 4 と結合して細胞周期に影響を与えることが報告されている (たとえば、Chen, J., Rappsilber, J., Chiang, Y. C., Russell, P., Mann, M., Denis, C. L., *J. Mol. Biol.* (2001) 314, 683-94 および Bai, Y., Salvatore, C., Chiang, Y. C., Collart, M. A., Liu, H. Y., and Denis, C. L., *Mol. Cell. Biol.* (1999) 19, 6642-6651 参照)。また、Caf1 は Tob と相互作用することが知られており、2つの因子が相互作用することによって細胞周期において G0 期から G1 期への移行にブレーキをかけている可能性が考えられている。*tob* 遺伝子をノックアウトしたマウスでは癌の発生率が優位に増加することが報告されている (たとえば、特開 2001-211782 号公報 (第 2 頁) 参照)。

一方、呼吸能が欠損した酵母を使用する技術としては、たとえば、異種のタンパク質の遺伝子を含む DNA で形質転換された当該酵母の形質転換体を使用するタンパク質の製造方法が知られている (たとえば、特開平 2-418 号公報 (特許請求の範囲、第 2 頁) 参照)。当該文献においては、タンパク質の製造に用いられる酵母の呼吸能を欠損させることにより遺伝子の発現が高まることが開示されている。

しかしながら、呼吸能が欠損した酵母を生理活性物質のスクリーニングに使用できることや、それにより当該スクリーニングの効率を高めることができることについての開示はない。

発明の開示

以上のような細胞周期調節に関与する因子、特に Tob ファミリータンパク質や

Caf ファミリータンパク質等のホ乳類の G0/G1 期の細胞内シグナル伝達に関与する因子と同様な機能または該機能を阻害もしくは増大する機能を有する生理的に活性な物質は、細胞の増殖や分化が関与する種々の疾患の予防剤および／もしくは治療剤となる可能性がある。たとえば、Tob の機能を阻害する物質は骨粗鬆症や骨折などの骨疾患の予防剤および／もしくは治療剤となる可能性があり、Caf1 と相互作用して Tob と同様の作用を発揮する物質は発癌予防剤および／もしくは抗癌剤となる可能性がある。

従って、本発明は、生理活性物質を効率的にスクリーニングすることができる、酵母を使用した生理活性物質のスクリーニング方法を提供することを目的とする。また、当該方法に使用される酵母、該スクリーニング方法により得られうる生理活性物質、ならびに該酵母を含んでなる生理活性物質のスクリーニング用キットを提供することを目的とする。

すなわち、本発明は、

〔1〕 (1) 異種タンパク質を発現可能であり、かつ該タンパク質の非発現下と比べて発現下に生育状態の変化が認められる形質転換酵母と被験試料とを接触させる工程、

(2) 該タンパク質を発現しうる条件下に該酵母を培養する工程、ならびに

(3) 該酵母の生育状態を測定する工程、

を含み、被験試料の非存在下を対照として被験試料の存在下に該酵母の生育が低下もしくは向上する場合に被験試料中に生理活性物質が存在すると判定する、生理活性物質のスクリーニング方法、

〔2〕 異種タンパク質が、その非発現下と比べて発現下に該酵母の生育を低下させるものである前記〔1〕記載のスクリーニング方法、

〔3〕 異種タンパク質が、ホ乳類細胞の細胞周期調節に関与するタンパク質である前記〔1〕または〔2〕記載のスクリーニング方法、

〔4〕 ホ乳類細胞の細胞周期調節に関与するタンパク質が、ホ乳類細胞の G 0

／G 1 期の細胞内シグナル伝達に關与するタンパク質である前記〔3〕記載のスクリーニング方法、

〔5〕 工程（3）において酵母の生育状態を、酵母培養液の濁度変化、酵母の形態変化、酵母の湿重量変化、酵母の乾燥重量変化、酵母の内因性酵素活性変化または酵母の内因性タンパク質量変化をモニターすることにより測定する、前記

〔1〕～〔4〕いずれか記載のスクリーニング方法、

〔6〕 形質転換酵母が、呼吸能を欠損したものである前記〔1〕～〔5〕いずれか記載のスクリーニング方法、

〔7〕 異種タンパク質を発現可能であり、かつ該タンパク質の非発現下と比べて発現下に生育状態の変化が認められる形質転換酵母、

〔8〕 生育状態の変化が生育の低下である前記〔7〕記載の形質転換酵母、

〔9〕 異種タンパク質が、少なくとも該タンパク質の活性部位を活性のある状態で保持してなるものである前記〔7〕または〔8〕記載の形質転換酵母、

〔10〕 異種タンパク質が、ホ乳類細胞の細胞周期調節に關与するタンパク質である前記〔7〕～〔9〕いずれか記載の形質転換酵母、

〔11〕 ホ乳類細胞の細胞周期調節に關与するタンパク質が、ホ乳類細胞のG 0／G 1 期の細胞内シグナル伝達に關与するタンパク質である前記〔10〕記載の形質転換酵母、

〔12〕 ホ乳類細胞のG 0／G 1 期の細胞内シグナル伝達に關与するタンパク質が、Tob ファミリーに属するタンパク質および／または Caf ファミリーに属するタンパク質である、前記〔11〕記載の形質転換酵母、

〔13〕 Tob ファミリーに属するタンパク質が、そのアミノ酸配列のN 末端領域に、

（a）配列番号：1 のアミノ酸配列を有するタンパク質、

（b）配列番号：1 のアミノ酸配列において少なくとも1つのアミノ酸残基の欠失、付加、挿入もしくは置換を有するアミノ酸配列を有するタンパク質であって、

発現下に形質転換酵母の生育阻害をもたらすタンパク質、

(c) 配列番号：1のアミノ酸配列との配列同一性が20%以上であるアミノ酸配列を有するタンパク質であって、発現下に形質転換酵母の生育阻害をもたらすタンパク質、または

(d) N末端から100アミノ酸残基までの領域において配列番号：2のアミノ酸配列との配列同一性が20%以上であるアミノ酸配列を有するタンパク質であって、発現下に形質転換酵母の生育阻害をもたらすタンパク質、

である、前記〔12〕記載の形質転換酵母、

〔14〕 Cafファミリーに属するタンパク質が、

(a) 配列番号：4のアミノ酸配列を有するタンパク質、

(b) 配列番号：4のアミノ酸配列において少なくとも1つのアミノ酸残基の欠失、付加、挿入もしくは置換を有するアミノ酸配列を有するタンパク質であって、発現下に形質転換酵母の生育阻害をもたらすタンパク質、または、

(c) 配列番号：4のアミノ酸配列との配列同一性が20%以上であるアミノ酸配列を有するタンパク質であって、発現下に形質転換酵母の生育阻害をもたらすタンパク質、

である、前記〔12〕記載の形質転換酵母、

〔15〕 プロモーターに発現可能に連結された異種タンパク質をコードする遺伝子を含含有してなるものである前記〔7〕～〔14〕いずれか記載の形質転換酵母、

〔16〕 前記〔6〕記載のスクリーニング方法用の、呼吸能を欠損してなる前記〔7〕～〔15〕いずれか記載の形質転換酵母、

〔17〕 前記〔1〕～〔6〕いずれかに記載のスクリーニング方法により得られる生理活性物質、ならびに

〔18〕 前記〔7〕～〔16〕いずれかに記載の酵母を含んでなる生理活性物質のスクリーニング用キット、

に関する。

図面の簡単な説明

第1図は、*tob* 遺伝子を導入した YPH500 α 株形質転換体の増殖曲線を示す図である。

第2図は、9時間培養した時点での *tob* 遺伝子を導入した YPH500 α 株形質転換体の培養液のウエスタンブロッティングの結果を示す図である。

第3図は、78時間培養した時点での *tob* 遺伝子を導入した YPH500 α 株形質転換体の培養液のウエスタンブロッティングの結果を示す図である。

第4図は、181時間培養した時点での *tob* 遺伝子を導入した YPH500 α 株形質転換体の培養液のウエスタンブロッティングの結果を示す図である。

第5図は、*tob* 遺伝子を導入した YNN27 株形質転換体の増殖曲線を示す図である。

第6図は、*tob* 遺伝子を導入した 20B-12 株形質転換体の増殖曲線を示す図である。

第7図は、*tob* 遺伝子を導入した YNN27 株形質転換体の培養液のウエスタンブロッティングの結果を示す図である。

第8図は、*tob* 遺伝子を導入した 20B-12 株形質転換体の培養液のウエスタンブロッティングの結果を示す図である。

第9図は、YPH500 α 株形質転換体における pESC-TRP の存在確認の結果を示すアガロースゲル電気泳動図である。

第10図は、YPH500 α 株形質転換体における pESC-TRP-*tob* の存在確認の結果を示すアガロースゲル電気泳動図である。

第11図は、*hcafl* 遺伝子を導入した YPH500 α 株形質転換体の増殖曲線を示す図である。

第12図は、*hcafl* 遺伝子を導入した YPH500 α 株形質転換体の培養液のウエス

タンブロットティングの結果を示す図である。

第13図は、*hcafl* 遺伝子を導入した INVSc1 株形質転換体の増殖曲線を示す図である。

第14図は、*hcafl* 遺伝子を導入した INVSc1 株形質転換体の培養液のウエスタンブロットティングの結果を示す図である。

第15図は、*tob* 遺伝子と *hcafl* 遺伝子を導入した INVSc1 株形質転換体の増殖曲線を示す図である。

第16図は、*tob* 遺伝子と *hcafl* 遺伝子を導入した INVSc1 株形質転換体の培養液のウエスタンブロットティングの結果を示す図である。

第17図は、*tob* 遺伝子を導入した YPH500-12 株 (ρ^-) 形質転換体の増殖曲線を示す図である。

第18図は、69時間培養した時点での *tob* 遺伝子を導入した YPH500-12 株 (ρ^-) 形質転換体の培養液のウエスタンブロットティングの結果を示す図である。

第19図は、*hcafl* 遺伝子を導入した YPH500-12 株 (ρ^-) 形質転換体の増殖曲線を示す図である。

第20図は、45時間培養した時点での *hcafl* 遺伝子を導入した YPH500-12 株 (ρ^-) 形質転換体の培養液のウエスタンブロットティングの結果を示す図である。

第21図は、*tob* 遺伝子と *hcafl* 遺伝子を導入した YPH500-12 株 (ρ^-) 形質転換体の増殖曲線を示す図である。

第22図は、144時間培養した時点での *tob* 遺伝子と *hcafl* 遺伝子を導入した YPH500-12 株 (ρ^-) 形質転換体の培養液のウエスタンブロットティングの結果を示す図である。

第23図は、*lck* 遺伝子を導入した YPH500-12 株 (ρ^-) 形質転換体の増殖曲線を示す図である。

第24図は、47時間培養した時点での *lck* 遺伝子を導入した YPH500-12 株 (ρ^-) 形質転換体の培養液のウエスタンブロットティングの結果を示す図である。

第25図は、*lckYF* 遺伝子を導入した YPH500-12 株 (ρ^-) 形質転換体の増殖曲線を示す図である。

第26図は、95時間培養した時点での *lckYF* 遺伝子を導入した YPH500-12 株 (ρ^-) 形質転換体の培養液のウェスタンブロッティングの結果を示す図である。

第27図は、4種類のベクターを同時に用いて *tob* 遺伝子を導入した YPH500-12 株 (ρ^-) 形質転換体の増殖曲線を示す図である。

第28図は、*tob* 遺伝子を導入した YPH500-12 株 (ρ^-) 形質転換体の増殖曲線を示す図である。

第29図は、168時間培養した時点での4種類のベクターを同時に用いて *tob* 遺伝子を導入した YPH500-12 株 (ρ^-) 形質転換体の培養液の Tob 抗体を用いたウェスタンブロッティングの結果を示す図である。

第30図は、168時間培養した時点での4種類のベクターを同時に用いて *tob* 遺伝子を導入した YPH500-12 株 (ρ^-) 形質転換体の培養液の myc 抗体を用いたウェスタンブロッティングの結果を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明の生理活性物質のスクリーニング方法では、異種タンパク質を発現可能である形質転換酵母を、該異種タンパク質を発現可能な条件下、すなわち、該酵母の生育状態が変化する条件下に培養し、その際、該酵母を被験試料と接触させ、被験試料が存在しない場合（非存在下）を対照として被験試料が存在する場合（存在下）に酵母の生育が低下もしくは向上する場合、被験試料中に生理活性物質が存在すると判定する。

本明細書において、「異種タンパク質」とは、酵母の生育状態に変化をもたらす酵母にとって異種のタンパク質をいう。「異種タンパク質」には、当該タンパク質と同様の機能を有するものである限り、その断片が含まれる。また、「異種タンパク質を発現可能」とは、該酵母が異種タンパク質をコードする遺伝子を含有

しており（すなわち、該酵母が該遺伝子で形質転換されており）、かつ当該タンパク質の発現が実際に可能であることをいう。また、「生理活性物質」とは、生体に対し何らかの生理作用を発揮しうる物質、例えば、細胞の増殖や分化に作用しうる物質、特にホ乳類細胞の G0/G1 期の細胞内シグナル伝達に影響を与えうる化合物、例えば、ホ乳類細胞の G0/G1 期の細胞内シグナル伝達に関与する因子と同様な機能または該機能を阻害もしくは増大する機能を有する化合物をいう。

本発明の生理活性物質のスクリーニング方法では、例えば、被験試料の非存在下および存在下で異種タンパク質を発現する酵母の増殖曲線をそれぞれ作成し、得られた増殖曲線を対比することで、被験試料の非存在下を対照とした被験試料の存在下での当該酵母の生育状態に対する被験試料の影響を正確に把握することができる。従って、被験試料中の生理活性物質の存在を高い信頼性をもって検出することができる。それゆえ、本発明のスクリーニング方法によれば、効率的に生理活性物質をスクリーニングすることができる。

本発明に使用される酵母は、異種タンパク質を発現可能なものである。該酵母は本発明に包含される。該酵母は、異種タンパク質を発現していない状態（非発現下）と比べて発現している状態（発現下）で生育状態の変化、例えば、生育の低下もしくは向上が認められるという性質を有する。また、本発明に使用される酵母としては、呼吸能が欠損したものであるのが好ましい。すなわち、異種タンパク質を発現可能な呼吸能を有する酵母に比べて、呼吸能が欠損した酵母は、（イ）生育状態の変化がより鋭敏であり、（ロ）異種タンパク質の非発現下においてはより安定した生育を示す。このような現象は、酵母の呼吸能の欠損と関係するものと推定されるが未だそのメカニズムの詳細は不明である。しかしながら、前記（イ）は、前記（ロ）が認められるという事実を考慮すると、呼吸能の欠損に伴う、例えば、異種タンパク質の発現量の増大（例えば、特開平 2-418 号公報参照）に単純に依存するものではない、と考えられる。

「生育の低下」とは、異種タンパク質の非発現下および発現下での酵母の増殖

曲線を得、それぞれの世代時間を求め、それらを対比した場合に、非発現下に比べて発現下に酵母の世代時間が長くなることをいう。また、世代時間の代わりに増殖速度を求めてもよい。その場合、対数増殖期の増殖曲線の傾きが小さくなることをいう。一方、「生育の向上」とは、非発現下に比べて発現下に酵母の世代時間が短くなることをいう。また、対数増殖期の増殖曲線の傾きが大きくなることをいう。「生育状態の変化がより鋭敏である」とは、同一種の異種タンパク質を発現する酵母個体間でバラツキなく一様な生育状態の変化が認められることをいう。

「安定した生育」とは、同一種の異種タンパク質の非発現下にある酵母個体間でバラツキなく一様な生育状態が示されることをいう。

増殖曲線は酵母の培養時間に対して増殖の程度を示す任意のパラメータ（例えば、後述の酵母培養液の濁度等）の値をプロットすることにより作成する。本発明の酵母の性質の具体的な評価方法については後述する。

異種タンパク質としては、酵母の生育状態に変化をもたらさうるタンパク質であれば特に限定されるものではない。当該タンパク質としては、好ましくは酵母の生育を低下もしくは向上させうるタンパク質であり、より好ましくは酵母の生育を低下させうるタンパク質である。また、当該タンパク質としては、好ましくは細胞の増殖や分化に関わるタンパク質、より好ましくはホ乳類細胞の細胞周期調節に関与するタンパク質である。中でも、ホ乳類細胞の G0/G1 期の細胞内シグナル伝達に関与するタンパク質が特に好ましい。

ここで、「ホ乳類細胞の G0/G1 期の細胞内シグナル伝達に関与するタンパク質（以下、シグナルタンパク質という）」とは、ホ乳類細胞における細胞周期のうち G0 期から G1 期および G1 期から S 期に至る過程に関与し、その進行または停止を制御する機能を有するタンパク質をいう。また、「ホ乳類細胞」とはホ乳類に由来する細胞であればよく、例えば、ヒト、サルなどの霊長類、マウス、ラット、モルモットなどのげっ歯類、ウシ、ブタなどの偶蹄類、ネコなどの食肉類、ゾウなどの長鼻類、ウマなどの奇蹄類、家兎などのウサギ類、コウモリなどの翼手類、カンガ

ルー、ワラビーなどの有袋類、カモノハシ、ハリモグラなど単孔類等由来の細胞が挙げられる。

シグナルタンパク質は一般に、それが酵母で発現された場合、酵母の生育を低下させる性質を有すると考えられる。かかるシグナルタンパク質としては、例えば、Tob ファミリーに属するタンパク質、Caf ファミリーに属するタンパク質、サイクリンファミリーに属するタンパク質、CDK(cyclin dependent kinase)ファミリーに属するタンパク質、Rb(retinoblastoma)ファミリー遺伝子産物に属するタンパク質、p53 ファミリー遺伝子産物に属するタンパク質、p21 ファミリー遺伝子産物に属するタンパク質、GADD45(growth arrest and DNA damage inducible)ファミリー遺伝子産物に属するタンパク質、E2F ファミリータンパク質に属するタンパク質、p15 ファミリー遺伝子産物に属するタンパク質、p16 ファミリー遺伝子産物に属するタンパク質、Arf ファミリー遺伝子産物に属するタンパク質、INK4 ファミリー遺伝子産物に属するタンパク質、TGF β ファミリーに属するタンパク質、ヒストンジエステラーゼ類等が挙げられる。

Tob ファミリーに属するタンパク質は、そのアミノ酸配列の N 末端領域に、通常、配列番号：1 に示すアミノ酸配列と相同性をもつ約 110 アミノ酸残基からなる相同性領域を有する。従って、当該タンパク質としては、①N 末端領域に配列番号：1 に示すアミノ酸配列を有するタンパク質、もしくは②該相同性領域を有するタンパク質が好ましい。前記②のタンパク質としては、その発現下に酵母の生育の低下をもたらさうるものである限り、その N 末端領域に、配列番号：1 のアミノ酸配列において少なくとも 1 つのアミノ酸残基の欠失、付加、挿入もしくは置換を有するアミノ酸配列を有するタンパク質であってもよく、また、配列番号：1 のアミノ酸配列との配列同一性が、好ましくは 20% 以上、より好ましくは 35% 以上、さらに好ましくは 50% 以上、さらに好ましくは 65% 以上、さらに好ましくは 80% 以上、特に好ましくは 90% 以上、最も好ましくは 95% 以上であるアミノ酸配列を有するタンパク質であってもよい。

さらに、Tob ファミリーに属するタンパク質の前記相同性領域には、N 末端から 100 アミノ酸残基までの領域に配列番号：2 に示すアミノ酸配列からなる Box A (GR Box とともいう) と呼ばれるさらに相同性の高い領域 (高度保存領域) が存在することが知られている。また、Tob ファミリーに属するタンパク質には、前記相同性領域に、当該 Box A に加えて配列番号：3 に示すアミノ酸配列からなる Box B と呼ばれる高度保存領域の存在が知られているものもある。Box A および Box B については、Tirone, F., (2001) J. Cell Physiol., 187, 155-165 を参照されたい。例えば、Box A および Box B の存在が知られている Tob ファミリーに属するタンパク質について具体的にそれらのアミノ酸配列上の位置を示せば、hTob は N 末端から 40～58 位に Box A を 76 位～95 位に Box B を有し、hTob2 は N 末端から 40～58 位に Box A を 76 位～96 位に Box B を有し、Pc3 は N 末端から 50～68 位に Box A を 124 位～143 位に Box B を有し、hAna は N 末端から 42～60 位に Box A を 88 位～117 位に Box B を有し、mBtg3 は N 末端から 42～60 位に Box A を 88 位～117 位に Box B を有し、hPc3B は N 末端から 42～60 位に Box A を 88 位～117 位に Box B を有する。よって、Tob ファミリーに属するタンパク質としては、その発現下に酵母の生育の低下をもたらさうるものである限り、N 末端から 100 アミノ酸残基までの領域に配列番号：2 のアミノ酸配列との配列同一性が、好ましくは 20% 以上、より好ましくは 35% 以上、さらに好ましくは 50% 以上、さらに好ましくは 65% 以上、さらに好ましくは 80% 以上、特に好ましくは 90% 以上、最も好ましくは 95% 以上であるアミノ酸配列を有するタンパク質であってもよい。

Tob ファミリーに属するタンパク質としては、Box A および Box B を共に有するものが好ましい。

Caf ファミリーに属するタンパク質は、hCaf1 に代表される。hCaf1 は配列番号：4 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質である。Caf ファミリーに属するタンパク質としては、その発現下に酵母の生育の低下をもたらさうるものである限り、

配列番号：4のアミノ酸配列において少なくとも1つのアミノ酸残基の欠失、付加、挿入もしくは置換を有するアミノ酸配列を有するタンパク質であってもよく、また、配列番号：4のアミノ酸配列との配列同一性が、好ましくは20%以上、より好ましくは35%以上、さらに好ましくは50%以上、さらに好ましくは65%以上、さらに好ましくは80%以上、特に好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上であるアミノ酸配列を有するタンパク質であってもよい。

なお、前記「少なくとも1つ」とは1もしくは数個の意である。また、本明細書において「N末端領域」という場合、当該領域はアミノ酸配列でN末端から始まり、N末端から400残基までの領域をいう。

アミノ酸配列の配列同一性とは、2つのアミノ酸配列間におけるアミノ酸残基の配列類似性をいう。配列同一性は、比較対象のアミノ酸配列の領域に渡って最適な状態にアラインメントされた2つの配列を比較することにより決定されうる。

配列同一性の数値（パーセンテージ）は、両方の配列に存在する同一のアミノ酸残基を決定して適合部位の数を決定し、次いで、比較対象の配列領域内のアミノ酸残基の総数で、前記適合部位の数を割り、得られた数値に100を乗ずることにより算出される。配列同一性は、配列解析ソフト、例えば、BLASTP、FASTA等のネットワークサービスを利用して求めることができる。

例えば、Tobファミリーに属するタンパク質としては、例えば、Tob、Tob2、Btg1、Pc3/Tis21/Btg2、Ana/Btg3、B9.10、Pc3K、Pc3B、B9.15等が挙げられる。Cafファミリーに属するタンパク質としては、例えば、Caf1、Caf2、POP2等が挙げられる。また、サイクリンファミリーに属するタンパク質としては、例えば、サイクリンA、サイクリンB、サイクリンD1、D2、D3、サイクリンE等が挙げられる。

本発明の酵母としては、本発明の所望の効果の発現の観点から、少なくともその活性部位を活性のある状態で保持してなる異種タンパク質（もしくはその断片）を発現可能であるものが好ましい。なお、本明細書において、断片でない、いわゆる完全タンパク質としての異種タンパク質とは、そのアミノ酸配列の全長から

なる完全なタンパク質または 1 もしくは数個のアミノ酸残基が欠失、付加等された実質的に完全なタンパク質をいう。一方、その断片とは完全タンパク質としての異種タンパク質の一部をいう。かかる断片は、好ましくは 5 残基以上、より好ましくは 5~100,000 残基、さらに好ましくは 10~50,000 残基、特に好ましくは 100~10,000 残基のアミノ酸からなるペプチドであるのが好適である。当該断片としては、例えば、シグナルタンパク質の活性部位を含む、好ましくは 5 残基以上、より好ましくは 5~100,000 残基、さらに好ましくは 10~50,000 残基、特に好ましくは 100~10,000 残基のアミノ酸からなるペプチドを挙げることができる。

「活性部位」とは、異種タンパク質がその活性を発揮するのに必要な部位をいう。例えば、シグナルタンパク質では、細胞周期の G0/G1 期の細胞内シグナル伝達に関与する機能を発現するために必要な部位に相当する。シグナルタンパク質の活性部位のアミノ酸配列上の位置および当該部位を構成するアミノ酸配列については未だ不明であるが、例えば、Tob の活性部位は、前記相同性領域に存在するものと推定される。Tob の活性部位を構成すると推定される相同性領域のアミノ酸配列を配列番号：1 に示す。

また、「活性を保持した状態」とは、活性部位が活性発現に必要な高次構造を有してなることをいう。例えば、シグナルタンパク質またはその断片の場合、それらが活性部位を活性のある状態で保持してなるものであるか否かは、その発現下に酵母の生育の低下が生ずるか否かにより評価することができる。すなわち、酵母の生育の低下が生じた場合、発現したシグナルタンパク質またはその断片は活性部位を活性のある状態で保持してなるものである、と判定する。

本発明の酵母としては、Tob ファミリーに属するタンパク質および／または Caf ファミリーに属するタンパク質を発現可能なものが好ましく、中でも Tob ファミリーに属するタンパク質および Caf ファミリーに属するタンパク質の両方を共に発現可能なものがより好ましい。例えば、Tob と Caf1 を酵母において同時に発現

させた場合、それらを各々単独で発現させる場合よりも酵母の生育の低下が増大する。それゆえ、Tob ファミリーに属するタンパク質および Caf ファミリーに属するタンパク質の両方を共に発現させることにより、酵母の生育の低下をより明確に捉えることが可能であると考えられる。より具体的には、Tob ファミリーのタンパク質として Tob、Tob2、Btg1、Pc3/Tis21/Btg2、Ana/Btg3、B9.10、Pc3K、Pc3B、B9.15 を、Caf ファミリーのタンパク質として Caf1、Caf2、POP2 を、また、Tob ファミリーのタンパク質と Caf ファミリーのタンパク質の組合せとして、ここに具体的に示すそれらのタンパク質の少なくとも1つずつの組み合わせを発現可能な酵母が、本発明の所望の効果の発現の観点から、特に好ましい。

本発明において好適に使用される呼吸能が欠損した酵母は、(i) 異種タンパク質（もしくはその断片）をコードする遺伝子で酵母を形質転換し、得られた酵母の呼吸能欠損株を得ることにより、又は (i i) 呼吸能欠損株を得た後、それを異種タンパク質（もしくはその断片）をコードする遺伝子で形質転換することにより、得ることができる。呼吸能を有する酵母は、呼吸能を欠損させる工程を実施しないこと以外は、後述するような通常の酵母を用いて同様にして得ることができる。

異種タンパク質（もしくはその断片）をコードする遺伝子による酵母の形質転換は、当該遺伝子を含有してなるベクター、好ましくは発現ベクターを酵母に導入することにより行うのが好適である。

発現ベクターは、通常、プロモーター、異種タンパク質をコードする遺伝子およびターミネーターを含んでなる。該遺伝子はプロモーターに発現可能に連結される。ここで、「プロモーターに発現可能に連結される」とは、遺伝子にコードされるタンパク質の発現がプロモーターの制御下に誘導されうるように該遺伝子が該プロモーターに連結されることをいう。また、該発現ベクターは、多くの場合、抗生物質耐性遺伝子、栄養要求性遺伝子、ならびに大腸菌で機能する複製起点を含んでなる。さらに、エンハンサーおよび酵母で機能する複製起点が含まれてい

てもよい。発現ベクターを構成するこれらの要素の配置関係は所望の効果を奏するように適宜決定することができる。

このような発現ベクターは、例えば、酵母ベクターとして知られる YIp 型、YEp 型、YRp 型、YCp 型の任意のプラスミドベクターにプロモーター、マルチクローニングサイト、ターミネーター等をこの順で導入した後、異種タンパク質をコードする遺伝子上流に翻訳開始コドン、下流に翻訳終止コドン付加したものを前記マルチクローニングサイトに導入することにより構築することができる。このような組換え発現ベクターの構築には慣用の組換え DNA 技術を利用できる（例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning : A Laboratory Manual 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 等参照）。前記プラスミドベクターとしては、異種タンパク質、例えば、シグナルタンパク質の発現量が多量である方が好ましいという観点から、YEp 型のプラスミドベクターが望ましい。もしくはプラスミドベクターの宿主内保持安定性が高いという観点から YCp 型のプラスミドベクターが望ましい。当該ベクターとしては、例えば、YEp24、YEp13 等が挙げられる。

前記プロモーターとしては、例えば、誘導可能な *AOX1*、*GAL1*、*GAL7*、*GAL10*、*LAC4*、*PHO5*、*SUC2* 等のプロモーターが好適に使用される。また、非誘導型の *ADH*、*PGK* 等の解糖系の酵素のプロモーターを使用してもよい。ターミネーターは使用するプロモーターに応じて任意のものを選択すればよい。選択マーカー遺伝子として使用する抗生物質耐性遺伝子としては、例えば、大腸菌用としてのアンピシリン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、酵母用としての G418 耐性遺伝子等が挙げられる。また、栄養要求性変異を相補する遺伝子としては、*LEU2*、*URA3*、*TRP1*、*HIS4*、*ADE2* 等が挙げられる。

また、本発明の発現ベクターの構築には、予め *GAL1* 等のプロモーターが組み込まれた種々のベクターを利用することもできる。かかるベクターとしては、例えば pESC Yeast Epitope Tagging Vectors (Stratagene 社製) 等が挙げられる。さ

らに、酵母において発現される異種タンパク質にタグ付加を所望する場合においても、前記 pESC Yeast Epitope Tagging Vectors にはタグがついているのでそれを用いればよい。この場合、タグに特異的な抗体もしくは特異的な親和性を用いて目的タンパク質の検出および精製を行うことができるという利点がある。

所望の異種タンパク質をコードする遺伝子の塩基配列についての情報は、例えば、ジーンバンク (GenBank) より入手可能である。異種タンパク質の好適な例としてのシグナルタンパク質をコードする遺伝子の例を挙げておく。例えば、Tob ファミリーに属するタンパク質および Caf ファミリーに属するタンパク質をそれぞれコードする遺伝子について、以下に各遺伝子名と対応するアクセッション番号を例示する：*tob* (アクセッション番号：D38305 (ヒト)；D78382 (マウス))、*tob2* (アクセッション番号：AB035207 (ヒト)；AB041225 (マウス))、*btg1* (アクセッション番号：X61123 (ヒト)；L16846 (マウス)；X64146 (G. domesticus))、*pc3/tis21/btg2* (アクセッション番号：M60921 (ラット)；M64292 (マウス)；Y09943 (ヒト))、*ana/btg3* (アクセッション番号：NM006806.1 (ヒト)；Z72000 (マウス))、*b9.10* (アクセッション番号：X73316 (X. leavis))、*pc3B* (アクセッション番号：AJ271351.1 (ヒト)；AJ005120 (マウス))、*b9.15* (アクセッション番号：X73317 (X. leavis))、*caf1* (アクセッション番号：L46722 (ヒト)；U21855 (マウス))、*pop2* (アクセッション番号：D12807 (Saccharomyces cerevisiae))。また、*pc3K* および *caf2* については、Prevot, D., Morrel, A-P., Voeltzel, T., Rostan, M-C., Rimokh, R., Magaud, J-P., and Corbo, L. (2001) J. Biol. Chem., 276, 9640-9648 および Beko, Z., Sopiczki, M., and Carr, A. M. (1998) Mol. Gen. Genet., 260, 434-443 を参照されたい。

得られた塩基配列についての情報に基づいて一対のプライマーを作製し、鋳型 DNA として、例えば、ヒトのゲノム DNA もしくは cDNA ライブラリーを用いてポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行うことにより、異種タンパク質、例えば、シグナルタンパク質またはその断片をコードする遺伝子を適宜増幅することができる。

例えば、Tob ファミリーもしくは Caf ファミリーに属するタンパク質として、前記する特定のアミノ酸配列において少なくとも1つのアミノ酸残基の欠失、付加、挿入もしくは置換を有するアミノ酸配列を有するタンパク質の発現を所望する場合には、例えば、当該アミノ酸配列をコードする遺伝子に対し公知のランダム変異導入法や部位特異的変異導入法により所望の変異を導入し、得られた遺伝子を酵母導入用の遺伝子として用いればよい。また、例えば、シグナルタンパク質の断片の発現を所望する場合には、例えば、所望の断片をコードする遺伝子領域のみが増幅されるように適宜プライマーの配列を選択してPCRを行い、得られた遺伝子を酵母導入用の遺伝子として用いればよい。また、該断片の発現は、シグナルタンパク質をコードする遺伝子の任意の位置にストップコドンを導入して発現させる方法や制限酵素により所望の部分ペプチドに対応する遺伝子領域を切り出し、適切な発現ベクターに導入して発現させる方法等によっても行うことができる。

通常、酵母の形質転換は1種の異種タンパク質をコードする遺伝子を含有してなる1種の発現ベクターを用いて行えばよい。例えば、*tob* もしくは *caf1* を含有してなる1種の発現ベクターで酵母を形質転換する。他方、それぞれ1種の異種タンパク質をコードする遺伝子を含有してなる2種以上の発現ベクターで、あるいは2種以上の異種タンパク質をコードする遺伝子を含有してなる1種の発現ベクターで酵母を形質転換してもよい。例えば、*tob* を含有してなる1種の発現ベクターと *caf1* を含有してなる1種の発現ベクターとを用いて、或いは *tob* と *caf1* とが間接的に連結されてなる遺伝子部分を含有してなる1種の発現ベクター（以下、タンデム化発現ベクターという）で酵母を形質転換する。

該タンデム化発現ベクターは、例えば、以下のようにして得られる。例えば、単一の発現ベクター内において、*tob* および *caf1* の転写がそれぞれ別個のプロモーターによって制御を受けることができるように、*tob* 等の遺伝子とプロモーターとを当該ベクター内に配置する。なお、これらの方法において使用されうるプ

ロモーターやその他の要素等は前記と同様である。

また、異種タンパク質をコードする遺伝子を相同組換えにより酵母の染色体へ挿入してもよい。例えば、該染色体における該遺伝子の所望の標的挿入部位の両側にある2つの塩基配列に各々相同性を有する塩基配列からなるフランキング配列の間に、例えば、*tob*等の遺伝子を配置してなるベクターを用いて酵母を形質転換すればよい。標的挿入部位としては、当該部位に*tob*等の遺伝子を挿入することで酵母の内因性プロモーターと該遺伝子とが発現可能に連結されうる部位が好ましい。かかる場合には、*tob*等の遺伝子は、酵母の内因性プロモーターの制御下に発現可能となるため、形質転換に用いるベクター中、該遺伝子はプロモーターと発現可能に連結されている必要は必ずしもない。一方、ベクター中、*tob*等の遺伝子を、例えば、誘導型のプロモーターと発現可能に連結しておき、プロモーターと共に該遺伝子を染色体に挿入し、外部より発現制御可能となるようにしてもよい。このようなベクターの構築には、YIp型ベクターのような組み込み型ベクターが好適に使用される。

前記のベクターによる酵母の形質転換は慣用の手法により行うことができる。例えば、酢酸リチウム法 (Ito, H. et al., J. Bacteriol., 153, 163-168(1983))、電気穿孔法 (エレクトロポレーション法) (Hashimoto, H. et al., Appl. Microbiol. Biotechnol., 21, 336-339(1985))、プロトプラスト法 (Hinnen, A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929-1933(1978)) 等により、酵母を形質転換することができる。形質転換操作後、好ましくは選択マーカー遺伝子の性質に応じて常法により形質転換された酵母を選抜する。得られた酵母は異種タンパク質（もしくはその断片）をコードする遺伝子を含むが、当該遺伝子を含むか否かについては、該酵母からDNAを抽出後、制限酵素を用いて、あるいはPCR法や公知の塩基配列決定法により確認することができる。本発明の酵母としては、本発明の所望の効果の発現の観点から、プロモーターに発現可能に連結された、異種タンパク質（もしくはその断片）をコードする遺伝子を含むものが好適である。

また、呼吸能が欠損した酵母は公知の方法により容易に得ることができる。酵母は嫌氣的条件でも好氣的条件でも生育が可能であり、前者の場合は細胞質内の解糖系により、後者の場合には、ミトコンドリア内の酸化的リン酸化により、生育に必要な ATP を獲得している。従って、ミトコンドリア DNA の一部あるいは全部を欠失させることによって呼吸能欠損株 (ρ^-) が得られる (酵母の解剖、柳島直彦、大嶋泰治、大隅正子編、講談社サイエンティフィク、p137~147, 1981 年)。なお、ミトコンドリア DNA の全部が欠失した呼吸能欠損株を ρ^0 と表わすことがあるが、本明細書では ρ^- と ρ^0 を総称して ρ^- と表わす。

呼吸能を有する酵母 (親株 ρ^+) から呼吸能欠損株 (ρ^-) を得る具体的な方法は、例えば、Burke, D., Dawson, D., Stearns, T. 著, Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics, 2000 年版, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2000 年) に記載されている。すなわち、親株をエチジウムブロマイドを含む培地で培養したのち、炭素源としてグルコースを含む培地では生育できるが、グリセロールを含む培地では生育できない菌株を分離することによって呼吸能欠損株を容易に得ることができる。また、頻度は低いが親株の単一コロニーの中から呼吸能欠損株を得ることができる。

以上のような所望の性質を有する本発明の酵母の調製に使用可能な酵母としては、例えば、Boone, Castenholz 著, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 第 2 版, Lippincott Williams and Wilkins 刊 (2000 年) に酵母として記載されている微生物群が挙げられる。酵母の種類は特に限定されるものではないが、例えば、サッカロミセス属、シゾサッカロミセス属、クルイペロマイセス属、ピキア属などの酵母が挙げられる。本発明においては、サッカロミセス属またはシゾサッカロミセス属に属する酵母を使用するのが好ましく、例えば、サッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) などを使用するのがより好ましい。なお、クルイペロマイセス属に属する酵母としては、例えば、クルイペロマイセス・ラクティ

ス (*Kluyveromyces lactis*) が、ピキア属に属する酵母としては、例えば、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) が挙げられる。

得られた酵母が所望の性質を有する酵母であるか否かは、異種タンパク質の非発現下での生育状態の安定性および／または異種タンパク質の発現下での酵母の生育状態の変化および／または該タンパク質の発現を確認することにより評価することができる。具体的には、例えば、後述の実施例A-1に記載の方法により評価することができる。なお、非誘導型のプロモーターを使用した場合には発現と非発現のオン・オフができないことから、かかるプロモーターを使用した酵母の性質評価においては、非発現下にある酵母として異種タンパク質をコードする遺伝子を含まないベクターを用いること以外は本発明の酵母と同様の操作により得られた酵母を用いる。一方、当該酵母は誘導型のプロモーターを使用した場合にも非発現下にある酵母として使用可能である。

得られた酵母は、それを使用するまでの間、適宜保存することが可能である。保存条件としては、菌体を液体培地に植菌して定常期に達するまで培養した後、培養液を集菌し、その沈殿を10%グリセロール溶液に懸濁したものを-80℃のフリーザーにて保存する、という条件が好適である。

本発明の酵母は異種タンパク質を発現するが、その結果、生育状態に変化が生ずるという性質を有する。そのメカニズムについて詳細は未だ不明であるが、該異種タンパク質が酵母の増殖および／または分化に関する調節機構に作用し該変化が生じているものと考えられる。

本発明の酵母は、本発明の生理活性物質のスクリーニング方法に好適に使用されるものであるが、以上のような性質を有することから、細胞の増殖や分化に関わる作用因子や、その作用メカニズムについての研究等においても種々の用途が期待される。従って、本発明の一態様として、本発明の酵母からなる、生理活性物質のスクリーニング用試薬、細胞の増殖や分化に関わる作用因子や、その作用メカニズムについての研究用試薬等が提供される。当該試薬は本発明の酵母その

ものからなってもよく、所望により任意に他の成分をさらに含ませてもよい。例えば、前記保存状態にある形態での提供が可能である。

本発明の生理活性物質のスクリーニング方法は、以上のような本発明の酵母を使用するものであるが、具体的には、

(1) 異種タンパク質を発現可能であり、かつ該タンパク質の非発現下と比べて発現下に生育状態の変化が認められる形質転換酵母と被験試料とを接触させる工程、

(2) 該タンパク質を発現しうる条件下に該酵母を培養する工程、並びに

(3) 該酵母の生育状態を測定する工程、

を含むものである。そして、被験試料の非存在下を対照として被験試料の存在下に該酵母の生育が低下若しくは向上する場合に被験試料中に生理活性物質が存在すると判定する。

本発明の酵母では、前記するように、発現する異種タンパク質が増殖および／または分化に関する調節機構に作用して生育状態の変化（例えば、生育の低下もしくは向上）が生ずるものと考えられる。従って、被験試料の存在下に異種タンパク質を発現する酵母を培養した際に、例えば、当該酵母が異種タンパク質の発現で生育が低下する酵母である場合、被験試料の非存在下に比べて酵母の生育が向上した時、あるいは当該酵母が異種タンパク質の発現で生育が向上する酵母である場合、被験試料の非存在下に比べて酵母の生育が低下した時、被験試料中の成分が、例えば、異種タンパク質等に結合し、該タンパク質等の作用に対し何らかの影響を与えているものと考えられる。例えば、酵母で発現する異種タンパク質が Tob の場合、被験試料を存在させることで被験試料の非存在下に比べて酵母の生育が向上した場合、該被験試料中の成分は Tob の機能を阻害する可能性がある。また、例えば、酵母で発現する異種タンパク質が Tob および Caf1 の両者である場合、Caf1 は Tob と相互作用してその効果を発揮することが知られていることから、被験試料を存在させることで被験試料の非存在下に比べて酵母の生育が向

上した場合、該被験試料中の成分は Caf1 と結合し得、Tob 様の作用を発揮する可能性がある。

本発明に使用される本発明の酵母には、前記するように、誘導型のプロモーターまたは非誘導型のプロモーターを使用可能である。以下においては、説明の簡略化の観点から、発現のオン・オフが可能で、異種タンパク質の発現制御が容易である誘導型のプロモーターを使用して得られた酵母を用いる場合について説明する。

被験試料としては特に限定されるものではないが、例えば、化学的に合成された合成化合物、植物や動物の組織から得られた抽出物およびそれらから精製された化合物、微生物や植物・動物細胞の培養液およびそれらから抽出／精製された化合物等が挙げられる。該試料は適宜任意のバッファー等で希釈したものであってもよい。

工程（１）において酵母を被験試料と接触させる方法は特に限定されるものではない。例えば、工程（２）では異種タンパク質を発現する条件下、すなわち、生育状態の変化が生ずる条件下に酵母の培養（本培養）を行うが、本培養前に異種タンパク質等を発現しない条件下、すなわち、生育状態の変化が生じない条件下において該酵母を前培養して種培養液を得、それを生育状態の変化が生ずる条件下にある培養液に添加して本培養を行う態様（態様１）では、酵母と被験試料との接触は、例えば、種培養液を本培養のための培養液に添加する際に同時に被験試料を添加して行うのが好適である。また、本培養において酵母を数分から数時間程度培養した後、異種タンパク質等の発現を制御するプロモーターに応じた所定の成分を培地に添加して生育状態の変化が生ずる条件とする態様（態様２）では、例えば、該成分を本培養のための培養液に添加する際に同時に被験試料を添加して酵母と被験試料とを接触させるのが好適である。

前培養は、例えば、酵母の培養に適した公知の培地に、適宜保存されていた酵母を接種して行う。培養は通常の酵母用培養条件、例えば、 $24 \sim 37^{\circ}\text{C}$ にて2

～3日間、好氣的または嫌氣的条件下で行う。また、培養は、例えば、フラスコ、試験管等で行えばよい。

本培養も前培養と同様の条件で行うことができるが、前記態様1の場合には酵母が生育状態の変化を生ずる条件下にある培地を用いる。例えば、異種タンパク質をコードする遺伝子が *GAL1* プロモーターの制御下に連結されている場合には、前培養に使用した培地にガラクトースを添加した培地を用いればよい。また、本培養は、多数の被験試料を同時に試験することができる等の理由から、マイクロタイタープレートのウェル中で行うこともできる。

工程(3)での酵母の生育状態の測定は、酵母の培養過程における菌体の増殖の程度の指標となる任意のパラメータを測定することにより行なう。酵母の生育状態の測定は、具体的には、例えば、酵母培養液の濁度変化、酵母の形態変化、酵母の湿重量変化、酵母の乾燥重量変化、酵母の内因性酵素活性変化または酵母の内因性タンパク質量変化をモニターすることにより行うのが好ましいが、これらの方法に限定されるものではない。酵母培養液の濁度変化は、本培養の際に培養液の濁度を、例えば、分光光度計により経時的に測定することによりモニターすることができる。同様に、酵母の形態変化は、例えば、光学顕微鏡により経時的に酵母の形態を観察することによりモニターすることができる。酵母の湿重量変化は培養液を経時的に回収して集菌（例えば、3,000rpmで10分間の遠心分離による）し、その重量を測定することにより、また、酵母の乾燥重量変化は集菌した酵母を乾燥（例えば、105℃で4時間の維持による）後、その重量を測定することにより、それぞれモニターすることができる。酵母の内因性酵素活性変化のモニターは、例えば、インペルターゼ、ヘキソキナーゼの活性を常法により経時的に測定することにより行うことができる。また、酵母の内因性タンパク質量変化のモニターは、生育段階によって発現量に変化しないタンパク質の量的変化をモニターすることが好ましく、例えば、アクチンや *URA3* の量を当該タンパク質に特異的な抗体によるウェスタンブロッティングにより経時的に測定することによ

り行うことができる。なお、本発明の酵母の生育状態の変化は種々の原因により培養途中で外れる場合があるため、モニターは10～300時間行うのが好適であり、80～200時間行うのがより好適である。

一方、対照として、工程（1）で酵母と被験試料とを接触させないこと以外は同様の操作を行い、同様に酵母の生育状態の測定を行う。

次いで、得られた結果に基づき、被験試料の非存在下を対照として被験試料の存在下に酵母の生育の低下もしくは向上が認められるか否かについて評価する。評価は、得られた酵母の生育状態の測定結果を時間に対してプロットすることにより酵母の増殖曲線を得、被験試料と接触させた場合に得られた酵母の増殖曲線と対照の増殖曲線とを対比することにより行うのが好適である。具体的には、被験試料の存在下および非存在下での酵母の増殖曲線を得、それぞれ世代時間を求め、それらを対比し、被験試料の非存在下に比べて存在下に酵母の世代時間が長くなる場合、被験試料の非存在下を対照として被験試料の存在下に酵母の生育の低下が認められた、と評価する。一方、被験試料の非存在下に比べて存在下に酵母の世代時間が短くなる場合、被験試料の非存在下を対照として被験試料の存在下に酵母の生育の向上が認められた、と評価する。また、世代時間の代わりに増殖速度を求めてもよい。この場合、増殖速度が遅くなった場合に、被験試料の非存在下を対照として被験試料の存在下に酵母の生育の低下が認められた、と評価する。また、増殖速度が速くなった場合に、被験試料の非存在下を対照として被験試料の存在下に酵母の生育の向上が認められた、と評価する。なお、酵母の生育状態の測定を酵母の形態変化をモニターすることにより行った場合は、形態変化を起こした細胞数をヘマトメーター等でカウントし、それを酵母の培養時間に対してプロットすることにより増殖曲線を得る。

以上の結果、被験試料の存在下に酵母の生育の低下もしくは向上が認められた場合、被験試料中に生理活性物質が存在すると判定する。当該生理活性物質は、異種タンパク質の発現に伴う本発明の酵母の生育状態の変化に対し何らかの影響

を及ぼしうる、例えば、当該変化を相殺しうるような活性を有することから、該活性を指標として、さらに、所望により、例えば、遠心分離、ろ過、液-液分配、吸着／溶出、クロマトグラフ、再結晶等を組み合わせ、公知の精製方法に従って該物質を単離することができる。

また、本発明は前記スクリーニング方法により得られうる生理活性物質を提供する。該生理活性物質は少なくともスクリーニング過程で使用する異種タンパク質の機能に関連した生理活性を有する。たとえば、異種タンパク質がシグナルタンパク質であった場合、該生理活性物質は細胞周期の制御機構に作用しうると考えられることから、たとえば、細胞周期の制御機構の解明等の研究や、細胞周期の制御機構の異常が発症や病態進行の原因のうちの少なくとも1つとなっている疾患等の治療または予防への使用が期待される。たとえば、Tob の機能を阻害する物質は骨粗鬆症や骨折などの骨疾患の治療剤となる可能性があり、Caf1 と相互作用して Tob と同様の作用を発揮する物質は抗癌剤となる可能性がある。

該スクリーニング方法により、生理活性物質として、たとえば、チロシンキナーゼ阻害剤が得られうるが、かかる物質はタンパク質のチロシン残基のリン酸化を阻害するという機能を有しており、該阻害剤は、たとえば、チロシンキナーゼがかかわる過剰な細胞内シグナル伝達が病態の悪化の原因となっている疾患の治療薬、より具体的には制癌剤などとして使用されうる。

本発明の生理活性物質を医薬製剤とする場合には、たとえば、経口または非経口投与に適した公知の有機または無機の担体、賦形剤、その他の添加剤を用いて常法に従って経口または非経口投与の固体状、半固体状または液状の製剤として調製できる。生理活性物質の投与量は、各物質の性質に応じ、所望の効果が得られうるように適宜調整すればよい。また、該製剤における生理活性物質の含有量は、その使用方法に応じて生理活性物質の所定量が投与できるようであれば特に限定されるものではない。

さらに、本発明の一態様として、本発明の酵母を含んでなる生理活性物質のス

クリーニング用キットを提供する。当該キットは本発明の生理活性物質のスクリーニング方法に好適に用いることができる。キットには、所望により、任意の培地、酵母の生育状態の測定に使用される種々の試薬（たとえば、タンパク質定量用試薬、形質転換用のプラスミドベクター、宿主の酵母、Tob 等の特異抗体、酵素活性定量試薬等）、および本発明の生理活性物質のスクリーニング方法を実施するための説明書等を含めてもよい。

実施例

以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はかかる実施例に限定されるものではない。

（A）呼吸能を有する酵母での実施例

以下の実施例において使用した菌株、培地、試薬、ならびに一般的な実験方法を、以下にまとめて示す。

1. 菌株

本実験で使用した菌株を表 1 に示す。

表 1

菌	株	遺伝子型
<i>E. coli</i>	JM109	<i>hsdR17</i> (rK ⁻ , mK ⁺) , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , Δ (<i>lac-proAB</i>) , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , F' <i>[traD36, proAB, lacI^q, lacZ ΔM15]</i> , <i>e14⁻</i> (<i>McrA⁻</i>)
<i>S. cerevisiae</i>	YPH500	<i>MATα</i> , <i>ura3-52</i> , <i>lys2-801^{amber}</i> , <i>ade2-101^{ochre}</i> , <i>trp1-Δ63</i> , <i>his3-Δ200</i> , <i>leu2-Δ1</i>
<i>S. cerevisiae</i>	YNN27	<i>MATα</i> , <i>trp1</i> , <i>ura3</i>
<i>S. cerevisiae</i>	20B-12	<i>MATα</i> , <i>trp1</i> , <i>pep4</i>
<i>S. cerevisiae</i>	INVSc1	<i>MATα</i> , <i>his3-Δ1</i> , <i>leu2</i> , <i>trp1-289</i> , <i>ura3-52</i>

2. 培地

培地は全てオートクレーブして用いた。各培地の組成については、酵母用の培地につき Burke, D., Dawson, D., Stearns, T. 著, Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics, 2000 年版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (2000 年) を、大腸菌用の培地につき Sambrook et al., Molecular cloning a laboratory Manual: A Laboratory Manual 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989 年) を参照のこと。

(1) 大腸菌の培養には、以下の培地を用いた。

- ・ LB 液体培地
- ・ LB 固形培地
- ・ LB+Amp (アンピシリン) 培地 (Amp 濃度 100 μ g/ml)

(2) 大腸菌の形質転換には、以下の培地を用いた。

- ・ SOB 培地
- ・ SOC 培地

(3) 酵母宿主の培養には、以下の培地を用いた。

- YPD 液体培地
- YPD 固形培地

(4) 酵母形質転換体の培養には、以下の培地を用いた。

- CSM 液体培地
- CSM 固形培地
- CSM-TRP 培地
- CSM-URA 培地
- CSM-TRP-URA 培地

3. 試薬

各試薬の組成については、酵母用につき Burke, D., Dawson, D., Stearns, T. 著, Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics, 2000 年版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (2000 年) を、大腸菌用につき Sambrook et al., Molecular cloning a laboratory Manual: A Laboratory Manual 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989 年) を参照のこと。

- TB (Transformation Buffer)
- 3M 酢酸ナトリウム (NaOAc) 溶液 (pH4.8)
- グルコースバッファー (Glucose buffer)
- 1%SDS-0.2N NaOH (プラスミド抽出用溶液 I I)
- TE
- 10×TBE
- アクリルアミド : ビス (30:0.8)
- 1.5M Tris-HCl バッファー (pH8.8)
- 0.5M Tris-HCl バッファー (pH6.8)
- サンプルバッファー (Sample buffer)
- Electro-blotting バッファー
- PBS

- ・ TPBS
- ・ 0.2M 酢酸リチウム (LiOAc) 溶液
- ・ 70% ポリエチレングリコール (PEG)

4. 実験方法

(1) 大腸菌 JM109 の形質転換

-80℃で保存してある JM109 のコンピテント細胞 100 μ l を氷上で溶解し、5 μ l のプラスミド DNA を加えて氷上で 30 分間静置した。42℃、30 秒間ヒートショックを行った後氷上で 2 分間静置し、SOC 培地を 0.9ml 加えてよく混合し、37℃で 45 分間培養した。それを Amp 濃度 100 μ g/ml の LB+Amp 固形培地にまき、37℃で一夜培養した。

(2) プラスミド DNA の中量調製法 (中量抽出)

30ml LB+Amp 液体培地で培養した菌体を遠心用チューブに移して室温で 8000rpm、5 分間遠心することによって集菌した。沈殿物に 3ml のリゾチーム溶液 (5mg リゾチーム/1ml グルコースバッファー) を添加、緩やかに溶解した後、氷上に 5 分間静置した。4ml の NaOH-SDS 溶液 (0.2N NaOH-1% SDS) を加えて緩やかに混合し、氷上に 5 分間静置した。3ml の 3M NaOAc 溶液 (pH4.8) を加え、緩やかに混合し、氷上に 10 分間静置した後、15,000rpm、15 分間、4℃で遠心を行った。上清を新しいチューブに移し、6ml のイソプロパノールを加えて-20℃に 20 分間静置した後、15,000rpm、15 分間、4℃で遠心を行った。沈殿を 2ml の 70%エタノールで洗浄した後、300 μ l の TE に溶解してエッペンドルフ (登録商標) チューブに移し、同じく 300 μ l の TE で遠心チューブを洗浄してエッペンドルフ (登録商標) チューブに移した (計 600 μ l)。6 μ l の 10mg/ml RNase を加えて 37℃で 20 分間インキュベートした後、フェノール抽出を 3 回、クロロホルム抽出を 3 回、エーテル抽出を 3 回行った。120 μ l の 5M NaCl 溶液と 240 μ l の 30% PEG#6000 を加えて混合した後-20℃で 40 分間静置し、4℃で 30 分間静置した。14000rpm、10 分間、4℃で遠心した後、沈殿を回収してチューブの中の水分を完全に除去し、80 μ l の滅菌水に溶

解した。4.8 μ l の 5M NaCl 溶液と 192 μ l のエタノールを加えて混合し、 -20°C で 30 分間静置した。14,000rpm、15 分間、 4°C で遠心した後、沈殿に 200 μ l の 70% エタノールを加えて緩やかに沈殿を洗った。14,000rpm、15 分間、 4°C で遠心した後沈殿を吸引ポンプで乾燥し、100 μ l の TE に溶解した。その後、 OD_{260} 値及び電気泳動によって濃度を測定した。

(3) PCR 法

$98^{\circ}\text{C} \cdot 30$ 秒間、 $60^{\circ}\text{C} \cdot 60$ 秒間、 $72^{\circ}\text{C} \cdot 90$ 秒間のサイクルを 25 サイクルという条件で行った。5ng/ μ l のサンプル DNA 10 μ l に対し 50 μ M のプライマーをそれぞれ 5 μ l ずつ、NEB \times 10 バッファーを 10 μ l、4mM 4dNTP ミックスを 10 μ l、NEB Vent pol (2U/ μ l) を 0.5 μ l、滅菌水を 59.5 μ l 加えて計 100 μ l に調整し、それに 10mg/ml の BSA を 1 μ l、ミネラルオイルを 60 μ l 加えて反応を行った。

(4) アガロースゲルの切り出しによる DNA の単離

中量抽出によって調製したプラスミド DNA 5 μ g 分を 100 μ l の系で制限酵素で処理後、Loading Dye 20 μ l を加えて 120 μ l とした。電気泳動装置「ミューピッド (登録商標)」(株式会社アドバンス製) の 6mm の幅のコーム 3 つを 1 つになるようにセロファンテープで巻き、0.7% のアガロースゲルを作製した。120 μ l のサンプルをゲルにアプライして泳動を行い、泳動終了後 365nm 長波長 DNA 切り出し用ランプをゲルにあてながらカッターナイフを用いて目的のバンドを切り出した。回収したゲルを 250 μ l の 0.5 \times TBE 入りの透析チューブに入れ、それをミューピッドにセットして通常の方法に泳動を 30 分間行い、その後逆方向に泳動を 30 秒間行った。0.5 \times TBE を回収してフェノール抽出を 2 回、エーテル抽出を 3 回行った。

(5) プラスミド DNA の小スケール調製法 (ミニプレップ)

エッペンドルフ (登録商標) チューブに入った 1.2ml LB+Amp 液体培地に形質転換した大腸菌のコロニーを接種し、 37°C 、一夜培養した。培養液を室温で 12,000rpm、1 分間遠心した後、100 μ l のグルコースバッファーを加えてボルテックスし、沈殿

を完全に懸濁した。150 μ l の NaOH-SDS 溶液 (0.2N NaOH-1% SDS) を加え、チューブを上下に振って穏やかに混ぜた後、氷中に 5 分間静置した。150 μ l の 3M 酢酸カリウムバッファーを加えて混合した後、500 μ l のフェノールを加えて混合し、4℃で 12,000rpm、5 分間の遠心を行った。上層 (約 500 μ l 回収) を別のチューブに移し、等量 (500 μ l) のクロロホルムを加えて 4℃で 12,000rpm、5 分間の遠心を行った。上層 (約 400 μ l 回収) を別のチューブに移し、二倍量 (800 μ l) のエタノールを加えてよく混ぜ、-20℃で 30 分間静置した後、4℃、14,000rpm、10 分間の遠心を行い、沈殿に 200 μ l の 70%エタノールを加えて軽く混合した。4℃、14,000rpm、5 分間の遠心を行い、沈殿を吸引ポンプで乾燥させた後、20 μ l の RNase 入り TE (10mg/ml RNase 1 μ l-TE 20 μ l) に溶解し、37℃で 30 分間インキュベートした。その後、取得したプラスミド DNA を制限酵素で処理し、電気泳動による確認を行った。

(6) 酵母の形質転換 (酢酸リチウム法)

5ml の YPD 液体培地に酵母を植菌し、30℃、一夜の前培養を行った。培養液のうちの 1ml を 20ml の YPD 液体培地に植菌し、30℃で 4~6 時間、KU (Klett unit) 値が 60 前後になるまで培養した。培養液の OD₆₀₀ 値を測定し、測定値から菌体数が 2×10^8 cells になるように培養液の量を計算して計りとり、50ml の遠心チューブに移した。室温で 3000rpm、5 分間の遠心を行った後、沈殿を 10ml の TE に懸濁し、同様に室温で 3000rpm、5 分間の遠心を行った。沈殿を 1ml の TE に懸濁して 1ml の 0.2M 酢酸リチウム溶液を加え、30℃で 1 時間培養した (コンピテント細胞作製終了)。作製したコンピテント細胞を 200 μ l ずつ 1.5ml のチューブに分注し、それにそれぞれ 5 μ g 分の DNA を加え、氷上で 30 分間静置した。200 μ l の 70%PEG4000 を加えてよく混合し、30℃で 1 時間インキュベートした後、42℃で 5 分間のヒートショックを行った。その後すぐに 4℃、12,000rpm、5 分間の遠心を行い、沈殿を前もって氷上で冷やしておいた 1ml の滅菌水に懸濁した。4℃、12,000rpm、5 分間の遠心を行い、沈殿を冷却した 100 μ l の滅菌水に懸濁した後、CSM-TRP 固形培地に

まき、30℃で3～5日間培養した。なお、KU値は、Klett Summerson 光電光度計 (Klett Manufacturing 社製) により測定した。

(7) SDS-PAGE-ウエスタンブロッティング

①タンパク質の調製 (アルカリ-TCA-SDS 法)

5ml の培養液をエッペンドルフ (登録商標) チューブに移して 14,000rpm、5 分間遠心することによって集菌し、それを 2、3 回繰り返した。沈殿を 1.25ml の滅菌水に懸濁し、160 μ l の Me-NaOH を加えて氷上に 10 分間静置した。14,000rpm、20 分間遠心後、上清をピペットマンを用いて完全に除去し、沈殿に 1.5ml の冷アセトンを加え、ボルテックスおよび超音波処理で菌体を完全懸濁にした。氷上に 10 分間静置した後、14,000rpm、5 分間遠心して沈殿を回収し、エッペンドルフチューブのふたを開けてしばらく室温に静置し、アセトンをとばした (アセトン洗浄)。アセトン洗浄をもう一度行った後、沈殿を 150 μ l の 1% SDS/0.1M Tris-HCl バッファー (pH6.8) に溶解し、pH 試験紙で pH が中性かアルカリ性であることを確認した後、超音波処理で沈殿を溶解した。95℃、3 分間加熱した後、14,000rpm、5 分間遠心して上清を回収し、Lowry 法を用いてタンパク質の量を測定した。

②Lowry 法

本法については、「Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275」に記載されている。はじめに BSA (ウシ血清アルブミン) を用いて標準曲線を作成した。BSA を 10, 20, 30, 40, 50, 70, 90, 110, 130 μ g/200 μ l になるようにそれぞれ調整し、そのサンプルに 1ml の C 液を入れてボルテックスし、室温に 10 分間静置した。0.1ml の Lowry 試薬を加え、ボルテックス、室温で 30 分間静置した後、OD₇₅₀ と OD₅₀₀ の値を測定し、得られた値から標準曲線を作成した。同様にして目的サンプルの OD₇₅₀ と OD₅₀₀ の値を測定し、標準曲線に照らし合わせてタンパク質の量を決定した。

③ゲルの作製、準備および電気泳動

本法の実施には電気泳動装置 MODEL BE-230 (BIO CRAFT 社製) を用いた。分離

ゲルは 7% と 10% のものをそれぞれ用いた。ガラス平板、ガラスプレート、パッドを 70% エタノールできれいにふき取った後、それらをクリップでとめ、分離ゲルに 10% APS (Ammonium Peroxodisulfate) を加えてプレートに流し込み、その上に 1ml の滅菌水を流し込んだ。室温で 30 分間静置した後、滅菌水を捨てて残った水分をろ紙を用いて取り除いた後、濃縮ゲルに 10% APS を加えてプレートに流し込み、コームを差し込んで室温で 30 分間静置した。分離ゲルおよび濃縮ゲルの組成は Laemmli, U. K. (1970) Nature 227, 680-685, 1970 もしくは新生化学実験講座 1. タンパク質 I 分離・精製・性質, 日本生化学会 編, 東京化学同人, 1997 に記載されている。

作製したゲルのコームをはずし、小さい葉さじで残ったゲルをかきとり、コームの穴に残ったゲルを蒸留水で洗った。パッドをはずし、クリップで泳動層の上層と一緒に両端をとめ、泳動層の下層に泳動バッファーを入れて上層を下層にはめた。上層に新しい泳動バッファーを入れ、マーカーとサンプルをアプライした後、コードを接続して 30mA の電流で泳動を行った。泳動終了後、クリップをはずして分離ゲルのみを回収してタッパーに移した。

④ウエスタンブロッティング

Electro blotting バッファーにひたしたゲルと同じ大きさのろ紙 6 枚とニトロセルロース膜をウエスタンブロッティング用の電極板にろ紙 3 枚、ゲル、ニトロセルロース膜、ろ紙 3 枚の順に重ね、100mA で 1 時間、電流を流した。電流を流し終わった後、ニトロセルロース膜をプラスチックケースに移し、TPBS 中で一時間振とうし (20 分おきに液を交換)、5ml の TPBS に 5 μ l の一次抗体を加えて一時間振とうした。TPBS で 30 分間振とうした後 (10 分おきに液を交換)、5ml の TPBS に 5 μ l の 2 次抗体を加え、1 時間振とうした。PBS で 30 分間振とうした後 (10 分おきに液を交換)、6mg の 4-クロロ-1-ナフトールを 2ml のメタノールに溶解し、10ml の PBS と 5 μ l の H₂O₂ を加えたものにニトロセルロース膜を入れ、手で振とうして発光させた。滅菌水で 15~30 分間振とうした後、ろ紙とアルミホイルに包

んで保存した。

実施例 A-1 酵母 *Saccharomyces cerevisiae* における *tob* (*htob*) 遺伝子の発現 1

本実施例では *tob* 遺伝子を酵母 *Saccharomyces cerevisiae* YPH500 α 株に導入することにより菌体内において Tob タンパク質を発現させ、それによって引き起こされる酵母の生育状態の変化を観察した。すなわち、*tob* 遺伝子導入用プラスミドを構築し、構築したプラスミドを用いて酵母を形質転換して、その生育状態を観察した。

なお、ベクターとして pESC-TRP をサブクローニングに使用した。また、*tob* 遺伝子は、該遺伝子を含む pME18S-*tob* (pME18S の *Eco*RI 部位に *tob* 遺伝子を挿入したもの) のものを増幅して用いた。

(1) pESC-TRP- *tob* の作製

pME18S- *tob* を用いて大腸菌 JM109 の形質転換を行い、得られた形質転換体からプラスミド DNA の調製 (中量抽出) を行った。同様に pESC-TRP についても大腸菌の形質転換を行い、プラスミド DNA の調製 (中量抽出) を行った。調製したプラスミド pME18S- *tob* をテンプレートとし、

フォワードプライマー:

5'-cccggatcca tgcagcttga aatccaagta-3' (配列番号: 5)

リバースプライマー:

5'-cccgtcgcacg ttagccataa caggctggaa-3' (配列番号: 6)

を用いて PCR を行い、*tob* 遺伝子を増幅した。得られた PCR 産物を *Bam*HI と *Sal*I で処理した後、ゲルからの切り出しによって DNA を回収した。pESC-TRP についても *Bam*HI と *Sal*I で処理した後、ゲルからの切り出しによって DNA を回収した。これらの実験操作によって回収した *tob* 遺伝子と pESC-TRP の断片を用いてライゲーションを行い、大腸菌の形質転換を行った。得られた形質転換体をミニプレップに

よって確認した後、プラスミド DNA の調製（中量抽出）を行った。

（２）YPH500 α 株における Tob タンパク質の発現および生育実験

作製したプラスミドを用いて酢酸リチウム法により YPH500 α 株の形質転換を行った。得られた形質転換体を別の CSM-TRP 固形培地に植え継いで 30℃で 2～3 日間培養し、それによってトリプトファン要求性を持つ形質転換体を選抜した。そのプレートから 5ml の CSM-TRP Glc 液体培地にコロニーを植菌し、30℃で 2～3 日間振とう培養を行った。培養液 0.1ml をそれぞれ 2 本の 5ml CSM-TRP Gal 液体培地と 1 本の CSM-TRP Glc 液体培地に植え継ぎ、30℃で 4～7 日間振とう培養した。その間 2 時間おきに Tob タンパク質が発現している CSM-TRP Gal 液体培地の KU 値を測定し、それにより酵母の生育状態を観察した。また、もう一方の CSM-TRP Gal 液体培地の培養液からタンパク質を回収し、ウエスタンブロッティングを行うことにより、Tob タンパク質の発現を確認した。CSM-TRP Glc 液体培地に植菌した酵母を対数増殖期中期まで培養した後、5ml の CSM-TRP Gal 液体培地で洗浄し、懸濁した。それを 30℃で数時間培養した後、タンパク質を回収し、ウエスタンブロッティングを行った。

（３）Tob タンパク質の発現による YPH500 α 株の生育阻害の解析

酵母用のタンパク質発現ベクターである pESC ベクターは *GAL1* プロモーターを持ち、ガラクトースの存在下においてのみ目的遺伝子を発現させる。*tob* 遺伝子の発現による YPH500 α 株の生育状態の変化を調べるためにまずグルコースの入った培地で前培養を行い、その後ガラクトースの入った培地に植えかえることによって *tob* 遺伝子を発現させ、該酵母の生育を調べた。

実験方法としては、pESC-TRP、pESC-TRP- *tob* による YPH500 α 株形質転換体をつまようじの先を用いて 5ml の CSM-TRP Glc 液体培地に植菌し、30℃、170rpm で 2～3 日間振とう培養を行い、full growth まで培養した。その後、その培養液から 100 μ l とって 5ml の CSM-TRP Gal 液体培地に植菌し、同様の条件で 5～7 日間の培養を行った。2 時間ごとに KU 値を測定し、それぞれの酵母の生育状態につい

て調べた。

YPH500 α 株における *tob* 遺伝子の発現

YPH500 α 株について、培養時間に対して KU 値をプロットし増殖曲線を作成した。結果を第 1 図に示す。

なお、本明細書において図中、各プラスミド名は当該プラスミドにより形質転換した酵母の結果であることを示し、各プラスミド名の後の数字は当該プラスミドを用いて得られた別個の形質転換酵母であることを示す。

ベクターのみである pESC-TRP を導入した対照と比べ、*tob* 遺伝子の入った pESC-TRP-*tob* を導入した場合に明らかに生育が悪かった。すなわち、pESC-TRP-1、2、8 に比べ pESC-TRP-*tob*-6、11、15 は、世代時間および増殖速度を求めた場合、世代時間が長くなり、増殖速度が小さくなることから、pESC-TRP-*tob*-6、11、15 では生育状態が阻害されたと判定できる。この結果から YPH500 α 株における Tob タンパク質の発現は酵母の生育を阻害することが分かる。ただし、*tob* 遺伝子が生育を抑えるのは培養を始めてから 2、3 日間くらいであり、120 時間経過した段階では生育が対照であるベクターのみの場合に追いついてくるということも分かった。これは Tob は酵母を死滅させるのではなく生育を抑える（生育速度が遅い）ので長時間培養によって定常期に到達し、対照の酵母の生育に追いつく、ということが考えられる。また、使用しているプラスミドは多コピーのプラスミドなので、その安定性については不明であることから、培養の段階でプラスミドが抜け落ち、それによって Tob タンパク質の発現量が減ったため、ということも考えられる。また、培養の段階で自然突然変異が起こることによって Tob タンパク質に強い酵母が現れ、それらだけが生き残ってまた増殖を続け、最終的に対照と同じレベルまで増殖が追いついたということも考えられる。Tob は非常に分解されやすいタンパク質なので、分解されることによって生育が回復した、ということも考えられる。

以上の形質転換酵母を用いてさらに 2 回、また別の形質転換酵母を用いて同様

の実験を行ったが、同様の生育阻害が観察された。

また、前記同様の形質転換酵母を用いた別の実験で 9 時間、78 時間、181 時間培養した時点で培養を止め、その培養液を用いてウェスタンブロッティングを行った。前培養の CSM-TRP Glc 液体培地から 0.1ml ずつ別の CSM- TRP Glc 液体培地 1 本ずつと CSM-Gal 液体培地 2 本ずつに植菌した。CSM- TRP Glc 液体培地で定常期に達する直前まで培養し、集菌して CSM- TRP Gal 液体培地で洗浄した後、CSM-TRP Gal 液体培地に懸濁して 9 時間培養を行い、その培養液を用いてウェスタンブロッティングを行った。CSM- TRP Gal 液体培地の 1 本を増殖曲線の作成に用い、もう 1 本を 78 時間培養した時点（生育に差がある時点）で培養を止め、ウェスタンブロッティングを行った。増殖曲線作成用に培養していた培養液を 181 時間培養した時点で培養を止め、ウェスタンブロッティングを行った。9 時間培養した時点での結果を第 2 図に、78 時間培養した時点での結果を第 3 図に、181 時間培養した時点での結果を第 4 図に示す。各場合、実験条件により Tob タンパク質が捉えられない場合があったが、いずれの酵母についてもいずれかの実験条件では Tob タンパク質が捉えられ、したがって実質的には全ての場合に Tob タンパク質が捉えられたことになる。すなわち、ガラクトースを含んだ培地で Tob を発現させ、生育に差がある時点でタンパク質を回収した場合に Tob タンパク質が全てつかまった、という結果が得られた。なお、Tob タンパク質の検出には Tob 抗体（第 2 図および第 4 図）及び myc 抗体（第 3 図）を用いた。myc 抗体とは Tob タンパク質の C 末端に付与した myc タグに対する特異的抗体である。

実施例 A-2 酵母 *S. cerevisiae* における *tob* 遺伝子の発現 2

実施例 A-1 と同様にして、*S. cerevisiae* YNN27 株および 20B-12 株の形質転換体を各々得て、当該酵母の生育状態について調べた。

それぞれの形質転換体について増殖曲線を作成した。結果を第 5 図および第 6 図に示す。これらの菌株では培養を始めてしばらくは生育に差が見られなかった

が、YNN27 株で 48 時間頃から、20B-12 株では 24 時間頃からわずかだが差が見られた。しかも今回は培養を続けてもその差が縮まらず、持続して見られた。今回は前培養の CSM-TRP Glc 液体培地から 0.1ml ずつ別の CSM-TRP Glc 液体培地と CSM-Gal 液体培地にそれぞれ植菌し、CSM-Gal 液体培地は増殖曲線の作成に用いた。CSM-TRP Glc 液体培地を full growth の手前まで培養し、集菌して CSM-Gal 液体培地で洗浄した後、CSM-Gal 液体培地に懸濁して 5 時間培養を行い、その培養液を用いてウエスタンブロッティングを行った。また、Lowry 法によるタンパク質の定量は行わず、適当量のタンパク質をアプライした。YNN27 株についての結果を第 7 図に、20B-12 株についての結果を第 8 図に示す(タンパク質の検出には myc 抗体を用いた)。結果から分かるように、*tob* 遺伝子の入った全てのサンプルに関してははっきりとタンパク質の発現が見られた。

実施例 A-3 形質転換酵母におけるプラスミド DNA の存在確認

実施例 A-1 で使用した酵母形質転換体にプラスミドが正しく組み込まれているかどうか確認するために、酵母のミニプレップを行った。それぞれのプラスミドについて 3 つの形質転換体について酵母のミニプレップを行い、それを大腸菌に形質転換して得られた形質転換体についてそれぞれ 5 つずつ大腸菌のミニプレップを行い、制限酵素で切断して確認を行った。つまり 1 つのプラスミドについて 15 個のサンプルについて調べた。5ml の YPD 液体培地に酵母の形質転換体を植菌し、30℃、一夜培養した後、8000rpm、5 分間の遠心を行った。沈殿を 0.5ml の 1M リットル(pH 7.5) に溶解し、エッペンドルフ(登録商標)チューブに移した後、3.6 μ l の 2-メルカプトエタノールと 20 μ l の 2.5mg/ml zymolyase 60,000 を加え、37℃に 60 分間静置した。14,000rpm、20 秒間遠心した後、沈殿を 0.5ml の 50mM Tris pH 7.4, 20mM EDTA に溶解し、50 μ l の 10% SDS を加えてよく混合し、65℃に 30 分間静置した。0.2ml の 5M 酢酸カリウムを加え、氷上に 1 時間静置した後、14,000rpm、5 分間の遠心を行った。上層を別のエッペンドルフ(登録

商標) チューブに移し、同量のイソプロパノールを加えて混合し、室温に 5 分間静置した。14,000rpm、10 秒間の遠心を行った後、沈殿を 70% エタノールで洗浄し、沈殿を乾燥させ、300 μ l の RNase を含む TE に溶解した。37°C に 30 分間静置した後、フェノール抽出を 2 回、エーテル抽出を 3 回行い、エタノール沈殿を行った後、50 μ l の TE に溶解した。その後、調製した DNA 5 μ l を用いて大腸菌の形質転換を行い、得られた大腸菌の形質転換体からミニプレップによってプラスミド DNA を調製した。そして適当な制限酵素で切断した後、電気泳動によりプラスミドの確認を行った。pESC-TRP についての結果を第 9 図に、pESC-TRP-*tob* についての結果を第 10 図にそれぞれ示す。

pESC-TRP については、大腸菌のミニプレップを行った後、*Xba*I で切断してチェックした。その結果、それ以外は対照と同じ 5.5kb と 1.0kb のバンドの存在が確認できた。この結果から、pESC-TRP についてはほぼ完璧にプラスミドが酵母に形質転換されていることが確認できた。

pESC-TRP-*tob* については、大腸菌のミニプレップを行った後、*Sal*I と *Bam*HI で切断してチェックした。いくつか薄くて分かりづらいバンドがあるが、ほぼ全ての場合に対照と同じ 6.5kb と 1.2kb のバンドが確認できた。この結果から、pESC-TRP-*tob* についてもほぼ完璧にプラスミドが酵母に形質転換されていることが確認できた。

実施例 A-4 酵母 *S. cerevisiae* における *hcafl* 遺伝子の発現 1

本実施例では *hcafl* 遺伝子を酵母 *S. cerevisiae* YPH500 α 株に導入することにより菌体内において Caf タンパク質を発現させ、それによって引き起こされる酵母の生育状態の変化を観察した。すなわち、*hcafl* 遺伝子導入用プラスミドを構築し、構築したプラスミドを用いて酵母を形質転換して、その生育状態を観察した。

なお、ベクターとして pESC-URA をサブクローニングに使用した。また、*hcafl*

遺伝子は、該遺伝子を含む pcDNA3-*hcafl* (pcDNA3 の *Bam*HI-*Xho*I 部位に *hcafl*-myc 遺伝子を挿入したもの) のものを増幅して用いた。

(1) pESC-URA-*hcafl* の作製

pcDNA3-*hcafl* を用いて大腸菌 JM109 の形質転換を行い、得られた形質転換体からプラスミド DNA の調製 (中量抽出) を行った。同様に pESC-URA についても大腸菌の形質転換を行い、プラスミド DNA の調製 (中量抽出) を行った。調製したプラスミド pcDNA3-*hcafl* を *Bam*HI と *Xho*I で処理した後、ゲルからの切り出しによって DNA を回収した。pESC-URA についても *Bam*HI と *Xho*I で処理した後、ゲルからの切り出しによって DNA を回収した。これらの実験操作によって回収した *hcafl* 遺伝子と pESC-URA の断片を用いてライゲーションを行い、大腸菌の形質転換を行った。得られた形質転換体をミニプレップによって確認した後、プラスミド DNA の調製 (中量抽出) を行った。遺伝子導入部分の両側からシーケンスを行うことにより、導入遺伝子の塩基配列の確認を行った。

(2) YPH500 α 株における Caf タンパク質の発現および生育実験

作製したプラスミドを用いて酢酸リチウム法により YPH500 α 株の形質転換を行った。得られた形質転換体を別の CSM-URA 固形培地に植え継いで 30℃ で 2~3 日間培養し、それによってウラシル要求性を持たない形質転換体を選抜した。そのプレートから 5ml の CSM-URA Glc 液体培地にコロニーを植菌し、30℃ で 2~3 日間振とう培養を行った。培養液 0.1ml をそれぞれ 2 本の 5ml CSM-URA Gal 液体培地と 1 本の CSM-URA Glc 液体培地に植え継ぎ、30℃ で 4~7 日間振とう培養した。その間 2 時間おきに Caf タンパク質が発現している CSM-URA Gal 液体培地の KU 値を測定し、それにより酵母の生育状態を観察した。また、もう一方の CSM-URA Gal 液体培地の培養液からタンパク質を回収し、ウエスタンブロッティングを行うことにより、Caf タンパク質の発現を確認した。CSM-URA Glc 液体培地に植菌した酵母を対数増殖期中期まで培養した後、5ml の CSM-URA Gal 液体培地で洗浄し、懸濁した。それを 30℃ で数時間培養した後、タンパク質を回収し、ウエスタンブロッティングを行っ

た。

(3) Caf タンパク質の発現による YPH500 α 株の生育阻害の解析

酵母用のタンパク質発現ベクターである pESC ベクターは *GAL1* プロモーターを持ち、ガラクトースの存在下においてのみ目的遺伝子を発現させる。*hcafl* 遺伝子の発現による YPH500 α 株の生育状態の変化を調べるためにまずグルコースの入った培地で前培養を行い、その後ガラクトースの入った培地に植えかえることによって *hcafl* 遺伝子を発現させ、該酵母の生育を調べた。具体的な実験方法は実施例 A-1 と同様とした。

YPH500 α 株における *hcafl* 遺伝子の発現

YPH500 α 株についての生育状態の観察結果（増殖曲線）を第 11 図に示す。全体的に見て対照のベクターを導入した酵母と *hcafl* 導入酵母との間での生育の差は *tob* 遺伝子の場合ほど大きくはなかったが、同様に *hcafl* 遺伝子を導入した酵母形質転換体で生育阻害が認められた。

ウエスタンブロッティング用に培養していた CSM-URA Gal 液体培地を 70 時間培養した時点で培養を止め、アルカリー-TCA 法によりタンパク質を回収してウエスタンブロッティングを行った。また、同じくウエスタンブロッティング用に培養していた CSM-URA Glc 液体培地を対数増殖期中期まで培養した後、CSM-URA Gal 液体培地で洗浄し、懸濁した。その培地を 10 時間培養した後、タンパク質を回収してウエスタンブロッティングを行った。結果を第 12 図に示す。7.5% のアクリルアミドゲルに 50 μ g 分のタンパク質をアプライし、1 次抗体に myc 抗体を用いてタンパク質の検出を行った。図から分かるように、ほぼ全てのサンプルにおいて Caf タンパク質がとらえられた。

Tob のウエスタンブロッティングを行った際は Tob のバンド以外に菌体内のプロテアーゼによって分解された Tob のバンドが現れていたが、今回は Caf のバンドだけが得られた。これらの結果から Caf は非常に安定なタンパク質であると言える。これは動物細胞で行った実験においても同様の結果が示されており、酵母

における実験において動物細胞と同じ傾向の結果が得られた。

実施例 A-5 酵母 *S. cerevisiae* における *hcafl* 遺伝子の発現 2

実施例 A-4 と同様にして酵母 *S. cerevisiae* INVSc1 株に *hcafl* 遺伝子を導入し、生育を調べた。結果を第 13 図に示す。YPH500 α 株と比べて Caf による生育阻害の度合いは少ないが、生育のばらつきがない、安定した結果が得られた。

ウエスタンブロッティング用に培養していた CSM-URA Gal 液体培地を 24 時間培養した時点で培養を止め、アルカリ-TCA 法によりタンパク質を回収してウエスタンブロッティングを行った。結果を第 14 図に示す。前回同様、50 μ g 分のタンパク質を 7.5% のゲルにアプライして電気泳動を行い、一次抗体に myc 抗体を用いてタンパク質の検出を行った。

実施例 A-6 酵母 *S. cerevisiae* における *tob* 遺伝子と *hcafl* 遺伝子の同時発現

本実施例では *tob* 遺伝子と *hcafl* 遺伝子とを酵母 *S. cerevisiae* INVSc1 株に同時に導入することにより菌体内において Tob タンパク質と Caf タンパク質とを共に発現させ、それによって引き起こされる酵母の生育状態の変化を観察した。すなわち、以前構築した *tob* 遺伝子導入用プラスミドと *hcafl* 遺伝子導入用プラスミドとを用いて酵母を形質転換して、その生育状態を観察した。

形質転換用ベクターとして、pESC-TRP-*tob* (pESC-TRP の *Bam*HI-*Sal*I 部位に *tob* 遺伝子を挿入したもの) と pESC-URA-*hcafl* (pESC-URA の *Bam*HI-*Xho*I 部位に *hcafl* 遺伝子を挿入したもの) を用いた。

(1) INVSc1 株における Tob タンパク質と Caf タンパク質の同時発現および生育実験

前記プラスミドを用いて酢酸リチウム法により INVSc1 株の形質転換を行った。得られた形質転換体を別の CSM-TRP-URA 固形培地に植え継いで 30℃ で 2~3 日間

培養し、それによってトリプトファン要求性とウラシル要求性を合わせ持つ形質転換体を選抜した。そのプレートから 5ml の CSM-TRP-URA Glc 液体培地にコロニーを植菌し、30℃で 2～3 日間振とう培養を行った。培養液 0.1ml をそれぞれ 2 本の 5ml CSM-TRP-URA Gal 液体培地に植え継ぎ、30℃で 4～7 日間振とう培養した。その間、数時間おきに Tob タンパク質と Caf タンパク質が発現している CSM-TRP-URA Gal 液体培地の KU 値を測定し、それにより酵母の生育状態を観察した。また、もう一方の CSM-TRP-URA Gal 液体培地の培養液からタンパク質を回収し、ウエスタンブロッティングを行うことにより、Tob タンパク質と Caf タンパク質の発現を確認した。

(2) Tob タンパク質と Caf タンパク質の同時発現による INVSc1 株の生育阻害の解析

酵母用のタンパク質発現ベクターである pESC Vectors は *GAL1* プロモーターを持ち、ガラクトースの存在下においてのみ目的遺伝子を発現させる。*tob* 遺伝子と *hcafl* 遺伝子の同時発現による INVSc1 株の生育状態の変化を調べるためにまずグルコースの入った培地で前培養を行い、その後ガラクトースの入った培地に植えかえることによって *tob* 遺伝子と *hcafl* 遺伝子を同時発現させ、酵母の生育を調べた。

INVSc1 株における *tob* 遺伝子と *hcafl* 遺伝子の同時発現

INVSc1 株について、培養時間に対して KU 値をプロットし増殖曲線を作成した。結果を第 15 図に示す。

前記の INVSc1 株の実験で *tob* 遺伝子や *hcafl* 遺伝子を単独で導入した場合と同様に対照と比べて生育の阻害が認められ、その程度は単独の場合よりも大きかった。

ウエスタンブロッティングの結果を第 16 図に示す。7.5% アクリルアミドゲルに 50 μ g 分のタンパク質をアブライシ、一次抗体に myc 抗体を用いてタンパク質の検出を行った。図から分かるように、Tob タンパク質と Caf タンパク質がそれ

ぞれ明確にとらえられ、それぞれのタンパク質の発現が確認できた。

(B) 呼吸能を有する酵母での実施例

以下の実施例において使用した菌株を表 2 に示す。

表 2

菌	株	遺伝子型
<i>E. coli</i>	JM109	<i>hsdR17</i> (rK ⁻ , mK ⁺) , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , Δ (<i>lac-proAB</i>) , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , F' [<i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>lacI^q</i> , <i>lacZ</i> Δ M15], <i>e14⁻</i> (<i>McrA⁻</i>)
<i>S. cerevisiae</i>	YPH500-12	<i>MATα</i> , <i>ura3-52</i> , <i>lys2-801^{amber}</i> , <i>ade2-101^{ochre}</i> , <i>trp-Δ63</i> , <i>his3-1Δ200</i> , <i>leu2-Δ1</i> , ρ^0 (あるいは ρ^-)

また、酵母の呼吸能欠損株 (ρ^-) の取得は以下の方法により行った。

(1) 酵母の呼吸能欠損株 (ρ^-) の取得

5ml の 25 μ g/ml エチジウムブロマイド (EtBr) 添加 SD 培地 (0.67% Yeast Nitrogen Base w/o amino acid + 2% Glucose) に酵母親株 (ρ^+) を植菌し、full growth まで 30℃ で 3 日間培養した。その培養液から 0.1ml とって新しい EtBr 添加 SD 培地に植え継ぎ、full growth まで 30℃ で 3 日間培養した後、滅菌水で希釈して YPD プレートに塗布接種し、30℃ で 3 日間培養した。得られたシングルコロニーを YPD プレートと YP グリセロールプレートに植え継ぎ、呼吸能欠損株 (ρ^-) の取得を確認した。

なお、以下の実施例で使用した培地、試薬、ならびに一般的な実験方法は、前記 (A) で記載したものと同様である。。

実施例 B-1 酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の呼吸能欠損株における *tob*

(*htob*) 遺伝子の発現

本実施例では *tob(htob)* 遺伝子を酵母 *Saccharomyces cerevisiae* YPH500-12 株 (ρ^-) に導入することにより菌体内において Tob タンパク質を発現させ、それによって引き起こされる酵母の生育状態の変化を観察した。すなわち、*tob* 遺伝子導入用プラスミドを構築し、構築したプラスミドを用いて、前記方法により得られた酵母の呼吸能欠損株を形質転換し、その生育状態を観察した。

なお、ベクターとして pESC-TRP をサブクローニングに使用した。また、*tob* 遺伝子は、該遺伝子を含む pME18S-*tob* (pME18S の EcoRI 部位に *tob* 遺伝子を挿入したもの) のものを増幅して用いた。

(1) pESC-TRP-*tob* の作製

pME18S-*tob* を用いて大腸菌 JM109 の形質転換を行い、得られた形質転換体からプラスミド DNA の調製 (中量抽出) を行った。同様に pESC-TRP についても大腸菌の形質転換を行い、プラスミド DNA の調製 (中量抽出) を行った。調製したプラスミド pME18S-*tob* をテンプレートとし、

フォワードプライマー:

5'-cccggatcca tgcagcttga aatccaagta-3' (配列番号: 5)

リバースプライマー:

5'-cccgctcgacg ttagccataa caggctggaa-3' (配列番号: 6)

を用いて PCR を行い、*tob* 遺伝子を増幅した。得られた PCR 産物を BamHI と SalI で処理した後、ゲルからの切り出しによって DNA を回収した。pESC-TRP についても BamHI と SalI で処理した後、ゲルからの切り出しによって DNA を回収した。これらの実験操作によって回収した *tob* 遺伝子と pESC-TRP の断片を用いてライゲーションを行い、大腸菌の形質転換を行った。得られた形質転換体をミニプレップによって確認した後、プラスミド DNA の調製 (中量抽出) を行った。

(2) YPH500-12 株 (ρ^-) における Tob タンパク質の発現および生育実験

作製したプラスミドを用いて酢酸リチウム法により YPH500-12 株 (ρ^-) の形質

転換を行った。得られた形質転換体を別の CSM-TRP 固形培地に植え継いで 30℃で 2～3 日間培養し、それによってトリプトファン要求性を持つ形質転換体を選抜した。そのプレートから 5ml の CSM-TRP Glc (2%) 培地にコロニーを植菌して前々培養を行った。前々培養を 30℃で 162 時間行った時点で培養液から 0.1ml とって 5ml の CSM-TRP Raf (2%) 培地に植え継ぎ、さらに前培養を 122 時間行った後、培養液から 0.1ml とって 2 本ずつの 5ml の CSM-TRP Raf (2%) 培地と CSM-TRP Raf (2%) +Gal (2%) 培地にそれぞれ植え継ぎ、生育を観察した。ウエスタンブロッティング用のタンパク質の回収を 69 時間培養時点で行った。10%のアクリルアミドゲルを用いて 50 μ g 分のタンパク質を泳動し、次いでニトロセルロース膜に転写した。Tob タンパク質の検出には myc 抗体を用いた。myc 抗体とは Tob タンパク質の C 末端に付与した myc タグに対する特異的抗体である。

(3) Tob タンパク質の発現による YPH500-12 株 (ρ^-) の生育の低下の解析

酵母用のタンパク質発現ベクターである pESC ベクターは *GAL1* プロモーターを持ち、ガラクトースの存在下においてのみ目的遺伝子を発現させる。そこで、ガラクトースの存在下に形質転換酵母を培養し Tob タンパク質の発現を誘導した。

YPH500-12 株 (ρ^-) について培養時間に対して KU 値をプロットし増殖曲線を作成した。当該増殖曲線を第 17 図に示す。また、ウエスタンブロッティングの結果を第 18 図に示す。

第 17 図より、Tob タンパク質の非発現下 (Raf) および発現下 (Raf+Gal) で各形質転換酵母が概してバラツキなく様な生育を示すことが分かる。また、Tob タンパク質の非発現下と比べ、発現下で明らかに生育が低下することが分かる。すなわち、pESC-TRP-*tob*-19、22、23 (Raf) に比べ pESC-TRP-*tob*-19、22、23 (Raf+Gal) は、世代時間および増殖速度を求めた場合、世代時間が長くなり、増殖速度が小さくなることから、pESC-TRP-*tob*-19、22、23 (Raf+Gal) では生育の低下が生じたと判定できる。また、第 18 図に示すように、Tob タンパク質の発現条件下にある酵母では発現した Tob タンパク質が捉えられた。

実施例 B - 2 酵母 *S. cerevisiae* の呼吸能欠損株における *caf* (*hcaf1*) 遺伝子の発現

本実施例では *caf* (*hcaf1*) 遺伝子を酵母 *S. cerevisiae* YPH500-12 株 (ρ^-) に導入することにより菌体内において Caf タンパク質を発現させ、それによって引き起こされる酵母の生育状態の変化を観察した。すなわち、*hcaf1* 遺伝子導入用プラスミドを構築し、構築したプラスミドを用いて、前記方法により得られた酵母の呼吸能欠損株を形質転換し、その生育状態を観察した。

なお、ベクターとして pESC-URA をサブクローニングに使用した。また、*hcaf1* 遺伝子は、該遺伝子を含む pcDNA3-*hcaf1* (pcDNA3 の BamHI-XhoI 部位に *hcaf1-myc* 遺伝子を挿入したもの) のものを増幅して用いた。

(1) pESC-URA-*hcaf1* の作製

pcDNA3-*hcaf1* を用いて大腸菌 JM109 の形質転換を行い、得られた形質転換体からプラスミド DNA の調製 (中量抽出) を行った。同様に pESC-URA についても大腸菌の形質転換を行い、プラスミド DNA の調製 (中量抽出) を行った。調製したプラスミド pcDNA3-*hcaf1* を BamHI と XhoI で処理した後、ゲルからの切り出しによって DNA を回収した。pESC-URA についても BamHI と XhoI で処理した後、ゲルからの切り出しによって DNA を回収した。これらの実験操作によって回収した *hcaf1* 遺伝子と pESC-URA の断片を用いてライゲーションを行い、大腸菌の形質転換を行った。得られた形質転換体をミニプレップによって確認した後、プラスミド DNA の調製 (中量抽出) を行った。遺伝子導入部分の両側からシーケンスを行うことにより、導入遺伝子の塩基配列の確認を行った。

(2) YPH500-12 株 (ρ^-) における Caf タンパク質の発現および生育実験

実施例 B - 1 と同様にして Caf タンパク質の発現および生育実験を行った。なお、培地は CSM-URA 培地を使用した。また、ウエスタンブロッティング用のタンパク質の回収は 4 5 時間培養時点で行った。

(3) Caf タンパク質の発現による YPH500-12 株 (ρ^-) の生育の低下の解析

実施例 B-1 と同様にして YPH500-12 株 (ρ^-) の増殖曲線を作成した。当該増殖曲線を第 19 図に示す。また、ウエスタンブロッティングの結果を第 20 図に示す。

第 19 図より、Caf タンパク質の非発現下および発現下で各形質転換酵母が概してバラツキなく一様な生育を示すことが分かる。また、Caf タンパク質の非発現下と比べ、発現下で明らかに生育が低下することが分かる。すなわち、pESC-URA-*hcafl*-13、14、15、16 (Raf) に比べ pESC-URA-*hcafl*-13、14、15、16 (Raf+Gal) は、世代時間および増殖速度を求めた場合、世代時間が長くなり、増殖速度が小さくなることから、pESC-URA-*hcafl*-13、14、15、16 (Raf+Gal) では生育の低下が生じたと判定できる。また、第 20 図に示すように、Caf タンパク質の発現条件下にある酵母では発現した Caf タンパク質が捉えられた。

実施例 B-3 酵母 *S. cerevisiae* の呼吸能欠損株における *tob* 遺伝子と *hcafl* 遺伝子の同時発現

本実施例では *tob* (*htob*) 遺伝子と *caf* (*hcafl*) 遺伝子とを酵母 *S. cerevisiae* YPH500-12 株 (ρ^-) に同時に導入することにより菌体内において Tob タンパク質と Caf タンパク質とを共に発現させ、それによって引き起こされる酵母の生育状態の変化を観察した。すなわち、以前構築した *tob* 遺伝子導入用プラスミドと *hcafl* 遺伝子導入用プラスミドとを用いて、前記方法により得られた酵母の呼吸能欠損株を形質転換し、その生育状態を観察した。

(1) YPH500-12 株 (ρ^-) における Tob タンパク質と Caf タンパク質の発現および生育実験

YPH500-12 株 (ρ^-) を pESC-TRP-*tob* と pESC-URA-*hcafl* で同時に形質転換すること以外は実施例 B-1 と同様にして Tob タンパク質と Caf タンパク質の同時発現および生育実験を行った。なお、ウエスタンブロッティング用のタンパク質の回収

は 1 4 4 時間培養時点で行った。

(2) Tob タンパク質と Caf タンパク質の同時発現による YPH500-12 株 (ρ^-) の生育の低下の解析

実施例 B-1 と同様にして YPH500-12 株 (ρ^-) の増殖曲線を作成した。当該増殖曲線を第 21 図に示す。また、ウエスタンブロッティングの結果を第 22 図に示す。なお、図中、pESC-TRP-*tob* を pTtob と、pESC-URA-*hcaf1* を pUhcaf1 と、略して記載する。

第 21 図より、前記両タンパク質の非発現下および発現下で各形質転換酵母が概してバラツキなく一様な生育を示すことが分かる。また、両タンパク質の非発現下と比べ、発現下で明らかに生育が低下することが分かる。すなわち、pTtob+pUhcaf1-13、15、16、17 (Raf) に比べ pTtob+pUhcaf1-13、15、16、17 (Raf+Gal) は、世代時間および増殖速度を求めた場合、世代時間が長くなり、増殖速度が小さくなることから、pTtob+pUhcaf1-13、15、16、17 (Raf+Gal) では生育の低下が生じたと判定できる。また、Tob タンパク質と Caf タンパク質を酵母において同時に発現させた場合、それらを各々単独で発現させる場合よりも酵母の生育の低下が増大することが分かる。第 22 図に示すように、両タンパク質の発現条件下にある酵母では発現した Tob タンパク質と Caf タンパク質が捉えられた。

実施例 B-4 酵母 *S. cerevisiae* の呼吸能欠損株における *lck* 遺伝子の発現

本実施例では *lck* 遺伝子を酵母 *S. cerevisiae* YPH500-12 株 (ρ^-) に導入することにより菌体内において Lck タンパク質(チロシンキナーゼ)を発現させ、それによって引き起こされる酵母の生育状態の変化を観察した。すなわち、*lck* 遺伝子導入用プラスミドを構築し、構築したプラスミドを用いて、前記方法により得られた酵母の呼吸能欠損株を形質転換し、その生育状態を観察した。

なお、ベクターとして pESC-URA をサブクローニングに使用した。また、*lck* 遺伝子は、該遺伝子を含む pME18SH-*lck* (pME18SH [pME18S の元の HindIII 部位をつ

ぶして、その後 EcoRI 部位を HindIII 部位に改変したベクター] の HindIII 部位に *lck* 遺伝子を挿入したもの) のものを増幅して用いた。

のものを増幅して用いた。

(1) pU1ck の作製

pME18SH-*lck* を用いて大腸菌 JM109 の形質転換を行い、得られた形質転換体からプラスミド DNA の調製 (中量抽出) を行った。同様に pESC-URA についても大腸菌の形質転換を行い、プラスミド DNA の調製 (中量抽出) を行った。調製した pME18SH-*lck* をテンプレートとし、

フォワードプライマー:

5'-atgggctgtg gctgcagctc a-3' (配列番号: 7)

リバープライマー:

5'-cccgctcgaca ggctgaggct ggtactggcc-3' (配列番号: 8)

を用いて PCR を行い、*lck* 遺伝子を増幅した。得られた PCR 産物を SalI で処理した後、kinase によって末端のリン酸化を行い、その後ゲルからの切り出しによって DNA を回収した。pESC-URA を BamHI で処理した後、Klenow 酵素によって末端の平滑化を行った。それを SalI で処理した後、ゲルからの切り出しによって DNA を回収した。これらの実験操作によって回収した *lck* 遺伝子と pESC-URA の断片を用いてライゲーションを行い、大腸菌の形質転換を行った。得られた形質転換体をミニプレップによって確認した後、プラスミド DNA の調製 (中量抽出) を行った。遺伝子導入部分の両側からシーケンスを行うことにより、導入遺伝子の塩基配列の確認を行った。

(2) YPH500-12 株 (ρ^-) における Lck タンパク質の発現および生育実験

作製したプラスミドを用いて酢酸リチウム法により YPH500-12 株 (ρ^-) の形質転換を行った。得られた形質転換体を別の CSM-URA 固形培地に植え継いで 30℃ で 2~3 日間培養し、それによってウラシル要求性を持たない形質転換体を選抜した。そのプレートから 5ml の CSM-URA Raf (2%) 培地にコロニーを植菌し、前培養を 30℃

で 96 時間行った後、培養液から 0.1ml とって 2 本ずつの 5ml の CSM-URA Raf (2%) 培地と CSM-URA Raf (2%) +Gal (2%) 培地にそれぞれ植え継ぎ、生育を観察した。ウエスタンブロッティング用のタンパク質の回収を 47 時間培養時点で行った。7.5% のアクリルアミドゲルを用いて 50 μ g 分のタンパク質を泳動し、次いでニトロセルロース膜に転写した。Lck タンパク質の検出には myc 抗体を用いた。

(3) Lck タンパク質の発現による YPH500-12 株 (ρ^-) の生育の低下の解析

実施例 B-1 と同様にして YPH500-12 株 (ρ^-) の増殖曲線を作成した。当該増殖曲線を第 23 図に示す。また、ウエスタンブロッティングの結果を第 24 図に示す。

第 23 図より、Lck タンパク質の非発現下および発現下で各形質転換酵母が概してバラツキなく一様な生育を示すことが分かる。また、Lck タンパク質の非発現下と比べ、発現下で明らかに生育が低下することが分かる。すなわち、pUlk-2、3、4 (Raf) に比べ pUlk-2、3、4 (Raf+Gal) は、世代時間および増殖速度を求めた場合、世代時間が長くなり、増殖速度が小さくなることから、pUlk-2、3、4 (Raf+Gal) では生育の低下が生じたと判定できる。また、第 24 図に示すように、Lck タンパク質の発現条件下にある酵母では発現した Lck タンパク質が捉えられた。

実施例 B-5 酵母 *S. cerevisiae* の呼吸能欠損株における *lckYF* 遺伝子の発現と PP2 添加による生育抑制の解除

本実施例では *lckYF* 遺伝子を酵母 *S. cerevisiae* YPH500-12 株 (ρ^-) に導入することにより菌体内において LckYF タンパク質 (Src 型チロシンキナーゼ) を発現させ、それによって引き起こされる酵母の生育状態の変化を観察した。同時に、LckYF タンパク質を発現させた酵母を生育する際に代表的な Src 型チロシンキナーゼ選択的阻害剤である PP2 (4-アミノ-5-(4-クロロフェニル)-7-(*t*-ブチル)ピラゾロ [3, 4-*d*]ピリミジン) (CALBIOCHEM 製) を添加した酵母の生育状態の

変化を観察した。すなわち、*lckYF* 遺伝子導入用プラスミドを構築し、構築したプラスミドを用いて、前記方法により得られた酵母の呼吸能欠損株を形質転換し、その生育状態を観察すると同時に、培養の際に *lckYF* 遺伝子の発現産物である LckYF タンパク質の阻害剤 PP2 を添加した形質転換酵母の生育状態も観察した。

LckYF タンパク質とは、Lck タンパク質の 505 番目のチロシン (Tyr505) をフェニルアラニンに置換することによって作成した活性化型のタンパク質である。Lck タンパク質は Tyr505 がリン酸化されることによってその活性が低下することが知られている。そこで Tyr505 をフェニルアラニンに置換することによってそのリン酸化を阻害し、活性化させたタンパク質が LckYF タンパク質である。

なお、ベクターとして pESC-URA をサブクローニングに使用した。また、*lckYF* 遺伝子は、該遺伝子を含む pME-LckYF (pME18SH [pME18S のもとの *Hind*III 部位をつぶして、その *Eco*RI 部位を *Hind*III 部位に改変したベクター] の *Hind*III 部位に *lckYF* 遺伝子を挿入したもの) のものを増幅して用いた。また、*lck* 遺伝子は、該遺伝子を含む pME-Lck (pME18SH の *Hind*III 部位に *lck* 遺伝子を挿入したもの) のものを増幅して用いた。

(1) pESC-URA-*lckYF* の作製

pME-Lck をテンプレートとし、

フォワードプライマー：

5' -atgggctgtg gctgcagctc a-3' (配列番号：7)

リバースプライマー：

5' -cccgctgaca ggctgaggct ggtactggcc-3' (配列番号：8)

を用いて PCR を行い、*lck* 遺伝子を増幅した。得られた PCR 産物を *Sa*I で処理した後、キナーゼによって末端のリン酸化を行い、その後ゲルからの切り出しによって DNA を回収した。pESC-URA を *Bam*HI で処理した後、Klenow enzyme によって末端 DNA の平滑化を行った。その後 *Sa*I で処理した後、ゲルからの切り出しによって DNA を回収した。*lck* 遺伝子の断片と pESC-URA の断片を用いてライゲーション

ンを行い、大腸菌の形質転換を行った。得られた形質転換体をミニプレップによって確認した後、プラスミド DNA の調製（中量抽出）を行った。遺伝子導入部分の両側からシーケンスを行うことにより、導入遺伝子の塩基配列の確認を行った。構築したプラスミドを pESC-URA-lck と命名した。

その後 pME-LckYF をテンプレートとし、

フォワードプライマー：

5' -atgggctgtg gctgcagctc a-3' （配列番号：7）

リバースプライマー：

5' -cccgctcgaca ggctgaggct gaaactggcc-3' （配列番号：9）

を用いて PCR を行い、lckYF 遺伝子を増幅した。得られた PCR 産物を *Sma*I と *Sal*I で処理した後、ゲルからの切り出しによって DNA を回収した。pESC-URA-lck を *Sma*I と *Sal*I で処理した後、ゲルからの切り出しによって DNA を回収した。lckYF 遺伝子の断片と pESC-URA-lck の断片を用いてライゲーションを行い、大腸菌の形質転換を行った。得られた形質転換体をミニプレップによって確認した後、プラスミド DNA の調製（中量抽出）を行った。遺伝子導入部分の両側からシーケンスを行うことにより、導入遺伝子の塩基配列の確認を行った。構築したプラスミドを pESC-URA-lckYF と命名した。

（2）YPH500-12 株（ ρ^- ）における LckYF タンパク質の発現および生育実験

作製したプラスミドを用いて酢酸リチウム法により YPH500-12 株（ ρ^- ）の形質転換を行った。得られた形質転換体を別の CSM-URA 固形培地に植え継いで 30℃で 2～3 日間培養し、それによってウラシル要求性を持たない形質転換体を選抜した。そのプレートから 5 ml の CSM-URA Raf（2%）培地にコロニーを植菌し、前培養を 30℃で 3 日間行った後、培養液から 0.1 ml とって PP2 を終濃度 0、1、5 μ M となるように培地に添加した 5 ml の CSM-URA Raf（2%）+Gal（2%）培地に植え継ぎ、生育を観察した。ウエスタンブロッティング用のタンパク質の回収を 95 時間培養時点で行った。7.5%のアクリルアミドゲルを用いて 50 μ g 分のタンパク質を泳動し、

次いでニトロセルロース膜に転写した。LckYF タンパク質の検出には抗リン酸化チロシン抗体である 4G10 抗体を用いた。

(3) Lck タンパク質の発現による YPH500-12 株 (ρ^-) の生育低下と PP2 添加による生育低下抑制の解析

実施例 B-1 と同様にして YPH500-12 株 (ρ^-) の増殖曲線を作成した。当該増殖曲線を第 25 図に示す。また、ウエスタンブロッティングの結果を第 26 図に示す。

第 25 図より、LckYF タンパク質の非発現下および発現下で各形質転換酵母が概してバラツキなく一様な生育を示すことが分かる。また、LckYF タンパク質の非発現下と比べ、発現下で明らかに生育が低下することが分かる。さらに、PP2 を添加することによって用量依存的に LckYF タンパク質の発現下で認められる生育の低下が抑制されることがわかる。すなわち、 $0\mu\text{M}$ (pESC-URA) に比べて $0\mu\text{M}$

(pESC-URA-lckYF) は、世代時間および増殖速度を求めた場合、世代時間が長くなり、増殖速度が小さくなることから、 $0\mu\text{M}$ (pESC-URA-lckYF) では生育の低下が生じたと判定できる。加えて、PP2 を添加して培養を行った $1, 5\mu\text{M}$

(pESC-URA-lckYF) では、世代時間と増殖速度が $0\mu\text{M}$ (pESC-URA) と $0\mu\text{M}$

(pESC-URA-lckYF) の間の値となり、添加濃度が増えるにつれて世代時間が短くなり、増殖速度が大きくなることから、用量依存的に LckYF タンパク質の発現に伴う生育低下が抑制された、すなわち、生育が向上したと判定できる。また、第 26 図に示すように、LckYF タンパク質の発現条件下にある酵母では発現した LckYF タンパク質によってリン酸化された酵母のタンパク質および LckYF タンパク質そのものが捉えられた。また、PP2 添加によって著しい生育の回復が見られた $5\mu\text{M}$ (pESC-URA-lckYF) については、PP2 を添加しない場合や $1\mu\text{M}$

(pESC-URA-lckYF) と比較して発現量の低下がみられた。この結果は PP2 添加によって LckYF タンパク質の活性が抑制されたことを示している。

実施例 B - 6 酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の呼吸能欠損株における 4 種類の発現ベクターを同時に用いた *tob* (*htob*) 遺伝子の発現

本実施例では 4 種類の発現ベクターを同時に用いて *tob* (*htob*) 遺伝子を酵母 *Saccharomyces cerevisiae* YPH500-12 株 (ρ^-) に導入することにより菌体内において Tob タンパク質を発現させ、それによって引き起こされる酵母の生育状態の変化を観察した。すなわち、4 種類の *tob* 遺伝子導入用プラスミドを構築し、構築した 4 種類のプラスミドを同時に用いて、前記方法により得られた酵母の呼吸能欠損株を形質転換し、その生育状態を観察した。

なお、ベクターとして pESC-TRP、pESC-URA、pESC-LUE、pESC-HIS をサブクローニングに使用した。また、*tob* 遺伝子は、該遺伝子を含む pME18S-Tob (pME18S の *EcoRI* 部位に *tob* 遺伝子を挿入したもの) のものを増幅して用いた。

(1) pESC-TRP-*tob* の作製

実施例 B - 1 と同様の方法を用いて pESC-TRP-*tob* を調製した。

(2) pESC-TRP-*tob* の作製

pME18S-Tob を用いて大腸菌 JM109 の形質転換を行い、得られた形質転換体からプラスミド DNA の調製 (中量抽出) を行った。同様に pESC-TRP についても大腸菌の形質転換を行い、プラスミド DNA の調製 (中量抽出) を行った。調製したプラスミド pME18S-Tob をテンプレートとし、

フォワードプライマー:

5'-cccggatcca tgcagcttga aatccaagta-3' (配列番号: 5)

リバースプライマー:

5'-cccgtcgacg ttagccataa caggctggaa-3' (配列番号: 6)

を用いて PCR を行い、*tob* 遺伝子を増幅した。得られた PCR 産物を *Bam*HI と *Sal*I で処理した後、ゲルからの切り出しによって DNA を回収した。pESC-TRP についても *Bam*HI と *Sal*I で処理した後、ゲルからの切り出しによって DNA を回収した。これらの実験操作によって回収した *tob* 遺伝子と pESC-TRP の断片を用いてライゲー

ションを行い、大腸菌の形質転換を行った。得られた形質転換体をミニプレップによって確認した後、プラスミド DNA の調製（中量抽出）を行った。

（３）pESC-URA-*tob* の作製

pESC-TRP-*tob* を *Bam*HI と *Sal*I で処理した後、ゲルからの切り出しによって DNA を回収した。pESC-URA についても *Bam*HI と *Sal*I で処理した後、ゲルからの切り出しによって DNA を回収した。これらの実験操作によって回収した *tob* 遺伝子と pESC-URA の断片を用いてライゲーションを行い、大腸菌の形質転換を行った。得られた形質転換体をミニプレップによって確認した後、プラスミド DNA の調製（中量抽出）を行った。

（４）pESC-LUE-*tob* の作製

pESC-TRP-*tob* を *Bam*HI と *Sal*I で処理した後、ゲルからの切り出しによって DNA を回収した。pESC-LUE についても *Bam*HI と *Sal*I で処理した後、ゲルからの切り出しによって DNA を回収した。これらの実験操作によって回収した *tob* 遺伝子と pESC-LUE の断片を用いてライゲーションを行い、大腸菌の形質転換を行った。得られた形質転換体をミニプレップによって確認した後、プラスミド DNA の調製（中量抽出）を行った。

（５）pESC-HIS-*tob* の作製

pESC-TRP-*tob* を *Bam*HI と *Sal*I で処理した後、ゲルからの切り出しによって DNA を回収した。pESC-HIS についても *Bam*HI と *Sal*I で処理した後、ゲルからの切り出しによって DNA を回収した。これらの実験操作によって回収した *tob* 遺伝子と pESC-HIS の断片を用いてライゲーションを行い、大腸菌の形質転換を行った。得られた形質転換体をミニプレップによって確認した後、プラスミド DNA の調製（中量抽出）を行った。

（６）YPH500-12 株（ ρ^- ）における Tob タンパク質の発現および生育実験

作製した４種類のプラスミドを同時に用いて酢酸リチウム法により YPH500-12 株（ ρ^- ）の形質転換を行った。得られた形質転換体を別の CSM-TRP-URA-LUE-HIS

固形培地に植え継いで 30℃で 2~3 日間培養し、それによってトリプトファン・ウラシル・ロイシン・ヒスチジン要求性を持つ形質転換体を選抜した。そのプレートから 5ml の CSM-TRP-URA-LUE-HIS Raf (2%) 培地にコロニーを植菌して前培養を行った。前培養を 30℃で 72 時間行った後、培養液から 100 μ l とって 900 μ l の CSM-TRP-URA-LUE-HIS Raf (2%)+Gal (2%) 培地に加え、それによって培養液を 10 倍希釈した。希釈した培養液を 40 μ l とってマイクロプレートに加え、それに 160 μ l の CSM-TRP-URA-LUE-HIS Raf (2%)+Gal (2%) 培地を加えることによってさらに 5 倍希釈を行った。これらの実験操作によって 50 倍希釈した培養液の入ったマイクロプレートを 30℃のインキュベーター内で振とう培養した。培養液の濁度をマイクロプレートリーダーを用いて経時的に測定することにより、生育を観察した。また、ウェスタンブロッティングを行う目的で試験管による培養を並行して行った。前培養の培養液から 100 μ l とって 5ml の CSM-TRP-URA-LUE-HIS Raf (2%)+Gal (2%) 培地に植え継ぎ、30℃のインキュベーター内で振とう培養した。ウェスタンブロッティング用のタンパク質の回収を 168 時間培養時点で行った。10%のアクリルアミドゲルを用いて 50 μ g 分のタンパク質を泳動し、次いでニトロセルロース膜に転写した。Tob タンパク質の検出には Tob 抗体 (免疫生物研究所製)、myc 抗体を用いた。

対照実験として、実施例 B-1 と同様にプラスミドとして pESC-TRP-*tob* のみを用いて形質転換を行う実験を行った。

(7) Tob タンパク質の発現による YPH500-12 株 (ρ^-) の生育の低下の解析

実施例 B-1 と同様にして YPH500-12 株 (ρ^-) の増殖曲線を作成した。

ただし、本実施例では、培養時に試験管の代わりに 96 ウェル・マイクロプレートを用い、クレット計の代わりにマイクロプレートリーダー (大日本製薬社製) を用いて 620nm における吸光度を測定することによって濁度の測定を行った。

4 種類のベクターを同時に用いて形質転換した酵母の増殖曲線を第 27 図に、対照実験の増殖曲線を第 28 図に示す。また、ウェスタンブロッティングの結果を第 29 図、第 30 図に示す。

なお、図中、4種類のプラスミドをあわせて4×pESC vectors と略して記載する。

第27図、第28図より、Tob タンパク質の非発現下（ベクターのみを導入したもの）および発現下（*tob* 遺伝子を組み込んだベクターを導入したもの）で各形質転換酵母が概してバラツキなく一様な生育を示すことが分かる。また、Tob タンパク質の非発現下と比べ、発現下で明らかに生育が低下することが分かる。さらに、4種類のベクターを同時に用いて発現させると生育の低下の程度が強くなることがわかる。また、第29図、第30図に示すように、Tob タンパク質の発現条件下にある酵母では発現した Tob タンパク質が捉えられた。

配列表フリーテキスト

配列番号：5 は、*tob* 遺伝子を増幅するためのプライマーの塩基配列である。

配列番号：6 は、*tob* 遺伝子を増幅するためのプライマーの塩基配列である。

配列番号：7 は、*lck* 遺伝子を増幅するためのプライマーの塩基配列である。

配列番号：8 は、*lck* 遺伝子を増幅するためのプライマーの塩基配列である。

配列番号：9 は、*lckYF* 遺伝子を増幅するためのプライマーの塩基配列である。

産業上の利用可能性

本発明により、生理活性物質を効率的にスクリーニングすることができる生理活性物質のスクリーニング方法が提供される。当該方法により得られる生理活性物質は、たとえば、ホ乳類の G0/G1 期の細胞内シグナル伝達に関与する因子と同様な機能または該機能を阻害もしくは増大する機能を有する。従って、当該生理活性物質は細胞の増殖や分化が関与する種々の疾患の治療剤および／または予防剤となる可能性がある。また、当該方法に使用される、異種タンパク質を発現可能な呼吸能を欠損した酵母は、当該タンパク質の非発現下と比べて発現下で生育状態が変化し、異種タンパク質を発現可能な呼吸能を有する酵母に比べ、前記変

化はより鋭敏であり、しかも、異種タンパク質の非発現下においてはより安定した生育を示す、という性質を有する。当該性質は、前記方法において、生理活性物質のスクリーニングの効率化に大きく寄与する。

請求の範囲

1. (1) 異種タンパク質を発現可能であり、かつ該タンパク質の非発現下と比べて発現下に生育状態の変化が認められる形質転換酵母と被験試料とを接触させる工程、

(2) 該タンパク質を発現しうる条件下に該酵母を培養する工程、ならびに

(3) 該酵母の生育状態を測定する工程、

を含み、被験試料の非存在下を対照として被験試料の存在下に該酵母の生育が低下もしくは向上する場合に被験試料中に生理活性物質が存在すると判定する、生理活性物質のスクリーニング方法。

2. 異種タンパク質が、その非発現下と比べて発現下に該酵母の生育を低下させるものである請求項1記載のスクリーニング方法。

3. 異種タンパク質が、ホ乳類細胞の細胞周期調節に関与するタンパク質である請求項1または2記載のスクリーニング方法。

4. ホ乳類細胞の細胞周期調節に関与するタンパク質が、ホ乳類細胞のG0/G1期の細胞内シグナル伝達に関与するタンパク質である請求項3記載のスクリーニング方法。

5. 工程(3)において酵母の生育状態を、酵母培養液の濁度変化、酵母の形態変化、酵母の湿重量変化、酵母の乾燥重量変化、酵母の内因性酵素活性変化または酵母の内因性タンパク質量変化をモニターすることにより測定する、請求項1～4いずれか記載のスクリーニング方法。

6. 形質転換酵母が、呼吸能を欠損したものである請求項 1 ～ 5 いずれか記載のスクリーニング方法。
7. 異種タンパク質を発現可能であり、かつ該タンパク質の非発現下と比べて発現下に生育状態の変化が認められる形質転換酵母。
8. 生育状態の変化が生育の低下である請求項 7 記載の形質転換酵母。
9. 異種タンパク質が、少なくとも該タンパク質の活性部位を活性のある状態で保持してなるものである請求項 7 または 8 記載の形質転換酵母。
10. 異種タンパク質が、ホ乳類細胞の細胞周期調節に関与するタンパク質である請求項 7 ～ 9 いずれか記載の形質転換酵母。
11. ホ乳類細胞の細胞周期調節に関与するタンパク質が、ホ乳類細胞の G 0 / G 1 期の細胞内シグナル伝達に関与するタンパク質である請求項 10 記載の形質転換酵母。
12. ホ乳類細胞の G 0 / G 1 期の細胞内シグナル伝達に関与するタンパク質が、Tob ファミリーに属するタンパク質および／または Caf ファミリーに属するタンパク質である、請求項 11 記載の形質転換酵母。
13. Tob ファミリーに属するタンパク質が、そのアミノ酸配列の N 末端領域に、
 - (a) 配列番号：1 のアミノ酸配列を有するタンパク質、
 - (b) 配列番号：1 のアミノ酸配列において少なくとも 1 つのアミノ酸残基の欠

失、付加、挿入もしくは置換を有するアミノ酸配列を有するタンパク質であって、発現下に形質転換酵母の生育阻害をもたらすタンパク質、

(c) 配列番号：1のアミノ酸配列との配列同一性が20%以上であるアミノ酸配列を有するタンパク質であって、発現下に形質転換酵母の生育阻害をもたらすタンパク質、または

(d) N末端から100アミノ酸残基までの領域において配列番号：2のアミノ酸配列との配列同一性が20%以上であるアミノ酸配列を有するタンパク質であって、発現下に形質転換酵母の生育阻害をもたらすタンパク質、である、請求項12記載の形質転換酵母。

14. Cafファミリーに属するタンパク質が、

(a) 配列番号：4のアミノ酸配列を有するタンパク質、

(b) 配列番号：4のアミノ酸配列において少なくとも1つのアミノ酸残基の欠失、付加、挿入もしくは置換を有するアミノ酸配列を有するタンパク質であって、発現下に形質転換酵母の生育阻害をもたらすタンパク質、または、

(c) 配列番号：4のアミノ酸配列との配列同一性が20%以上であるアミノ酸配列を有するタンパク質であって、発現下に形質転換酵母の生育阻害をもたらすタンパク質、

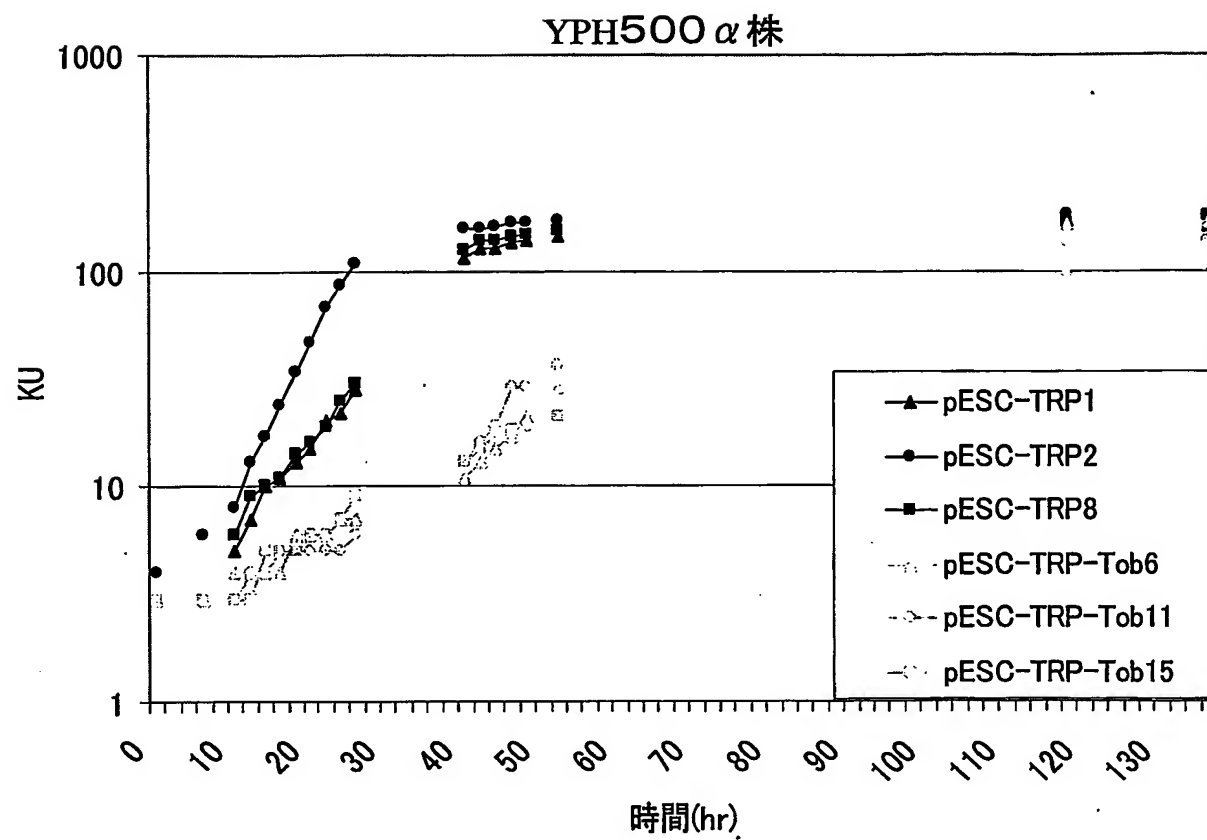
である、請求項12記載の形質転換酵母。

15. プロモーターに発現可能に連結された異種タンパク質をコードする遺伝子を含むものである請求項7～14いずれか記載の形質転換酵母。

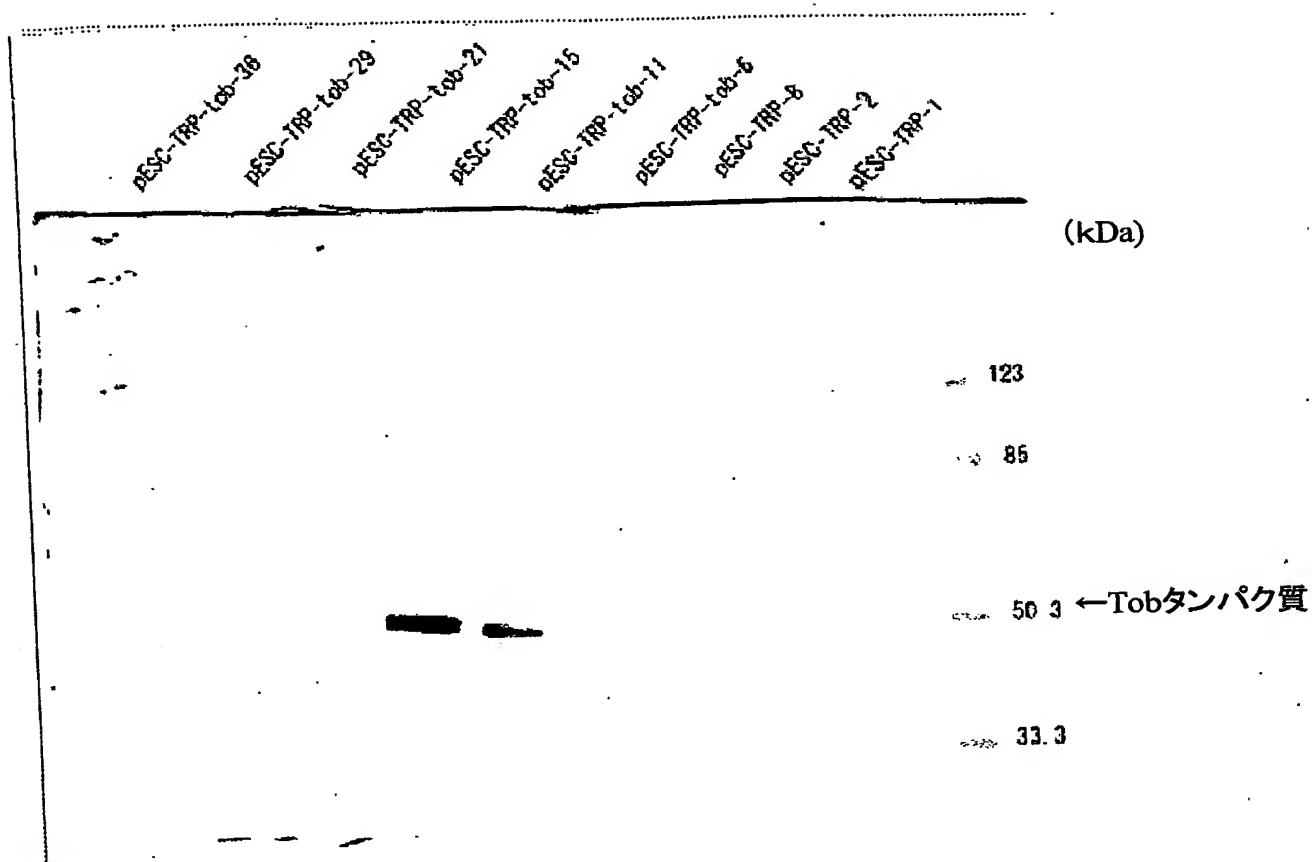
16. 請求項6記載のスクリーニング方法用の、呼吸能を欠損してなる請求項7～15いずれか記載の形質転換酵母。

17. 請求項1～6いずれかに記載のスクリーニング方法により得られうる生理活性物質。

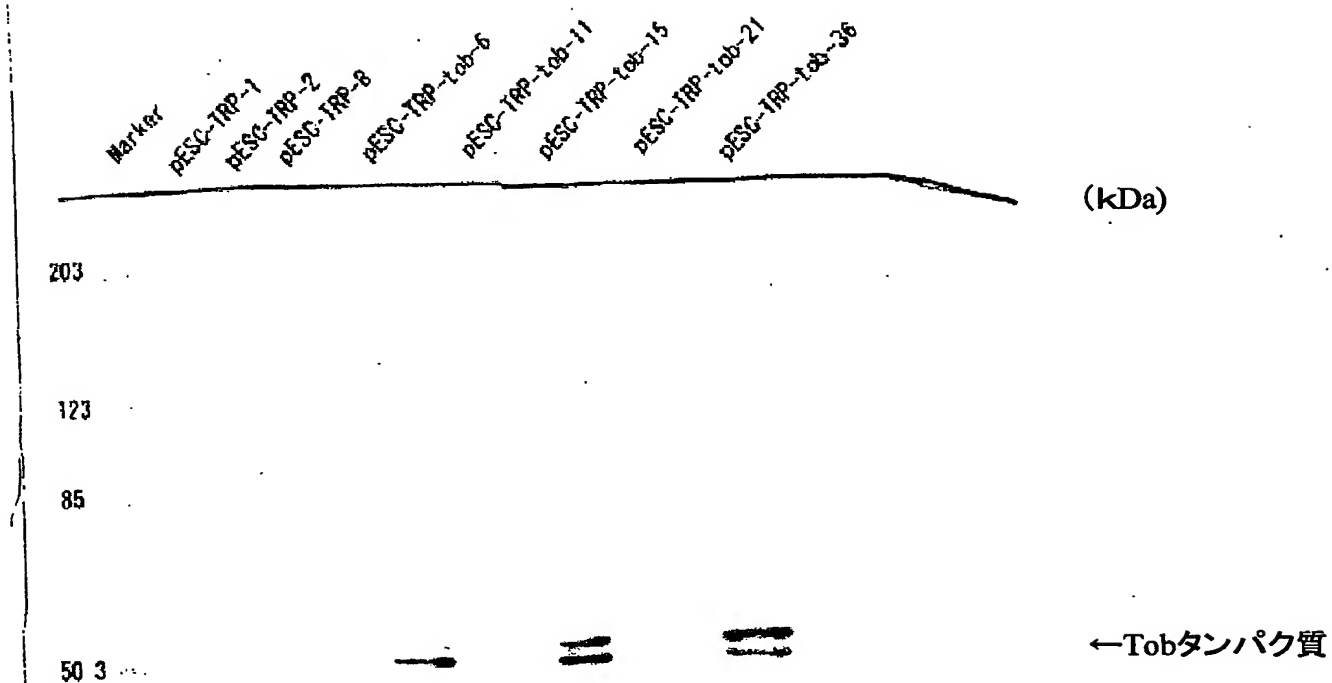
18. 請求項7～16いずれかに記載の酵母を含んでなる生理活性物質のスクリーニング用キット。



第1図



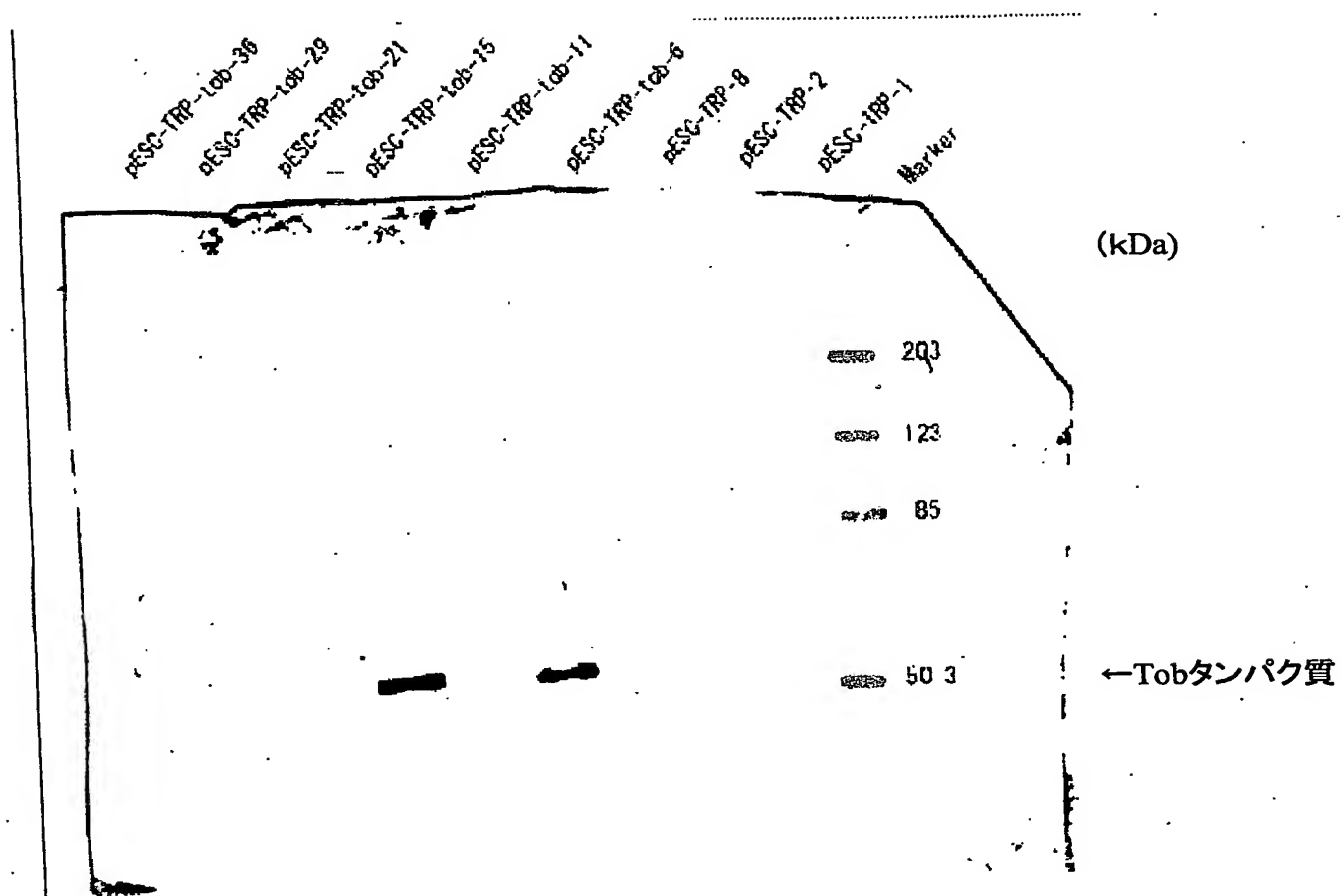
第2図



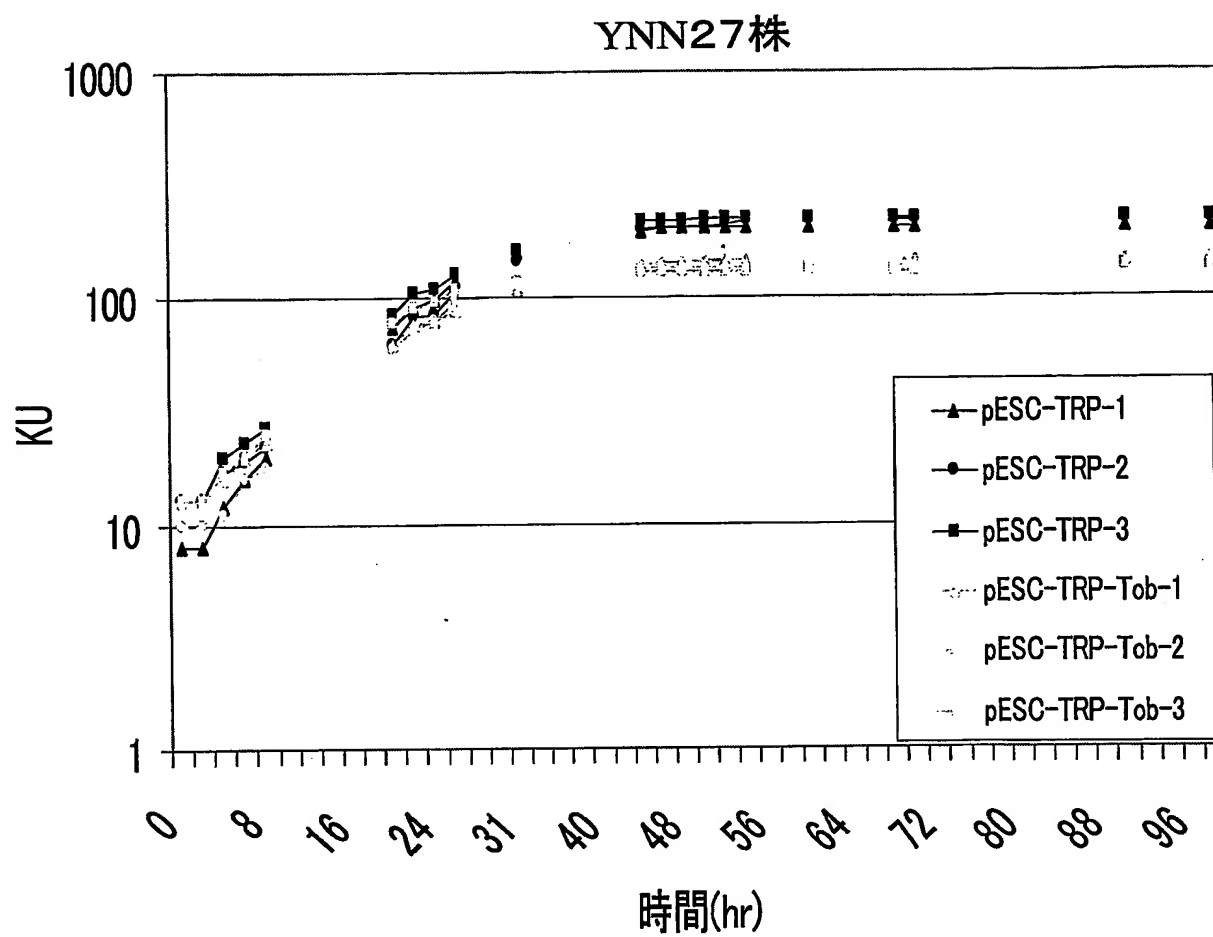
第3図

3/30

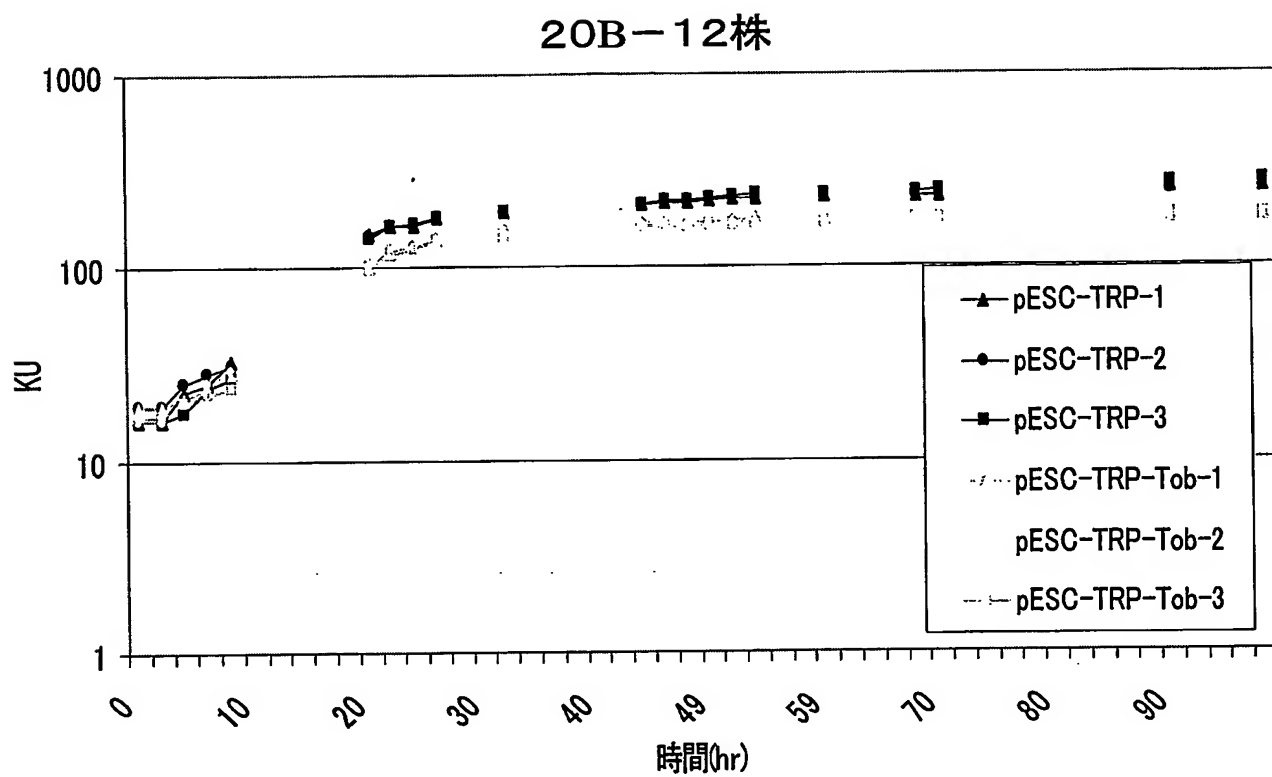
BEST AVAILABLE COPY



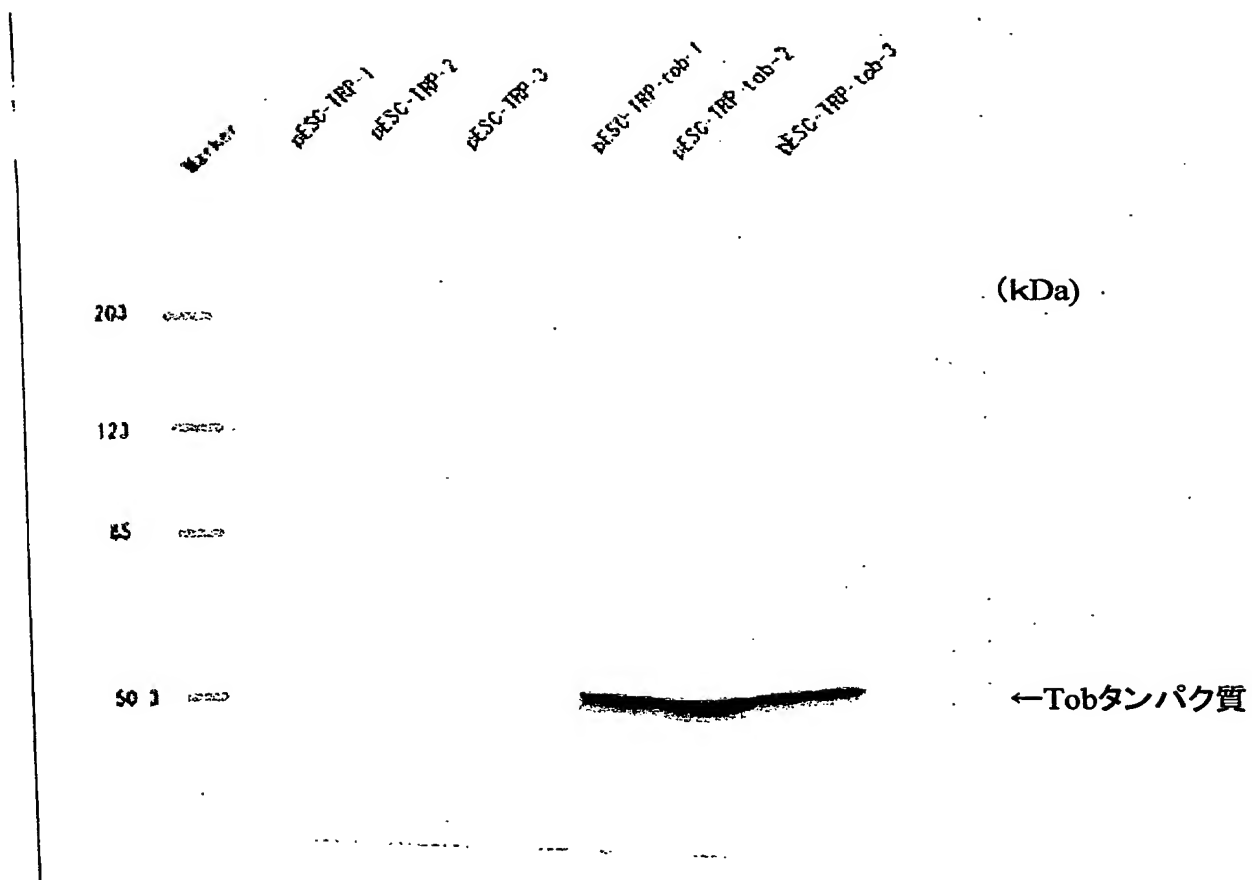
第4図



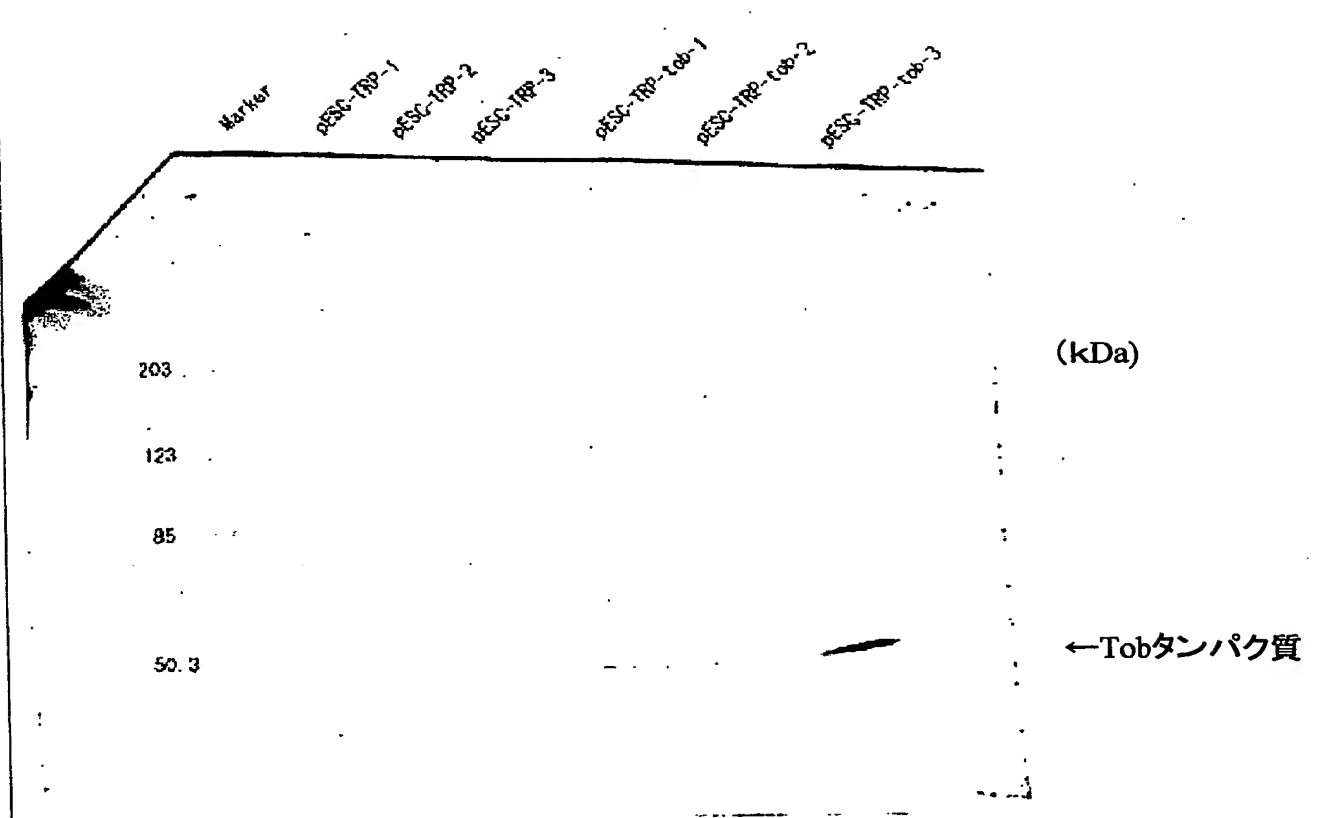
第5図



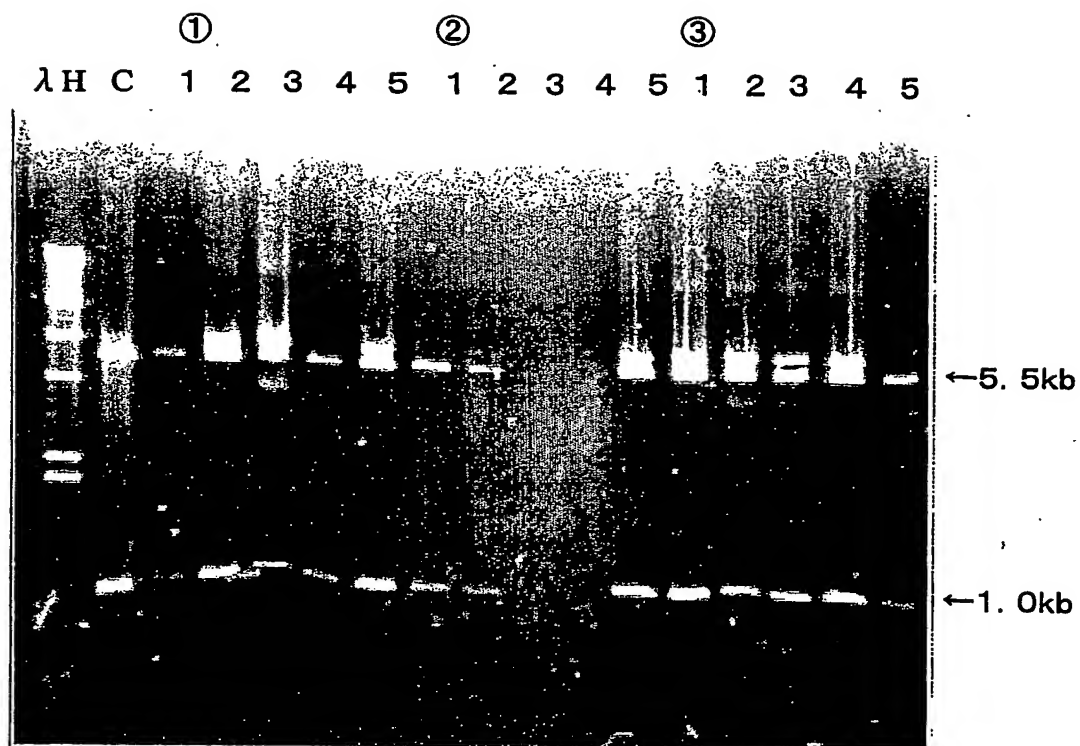
第6図



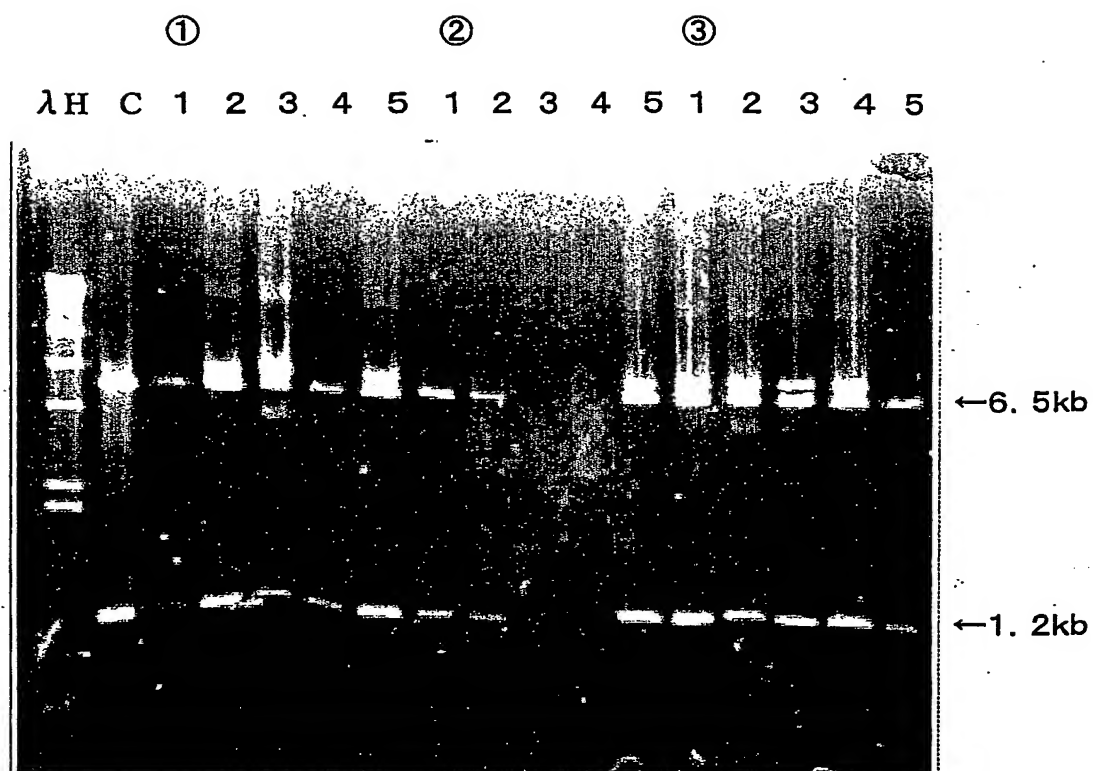
第7図



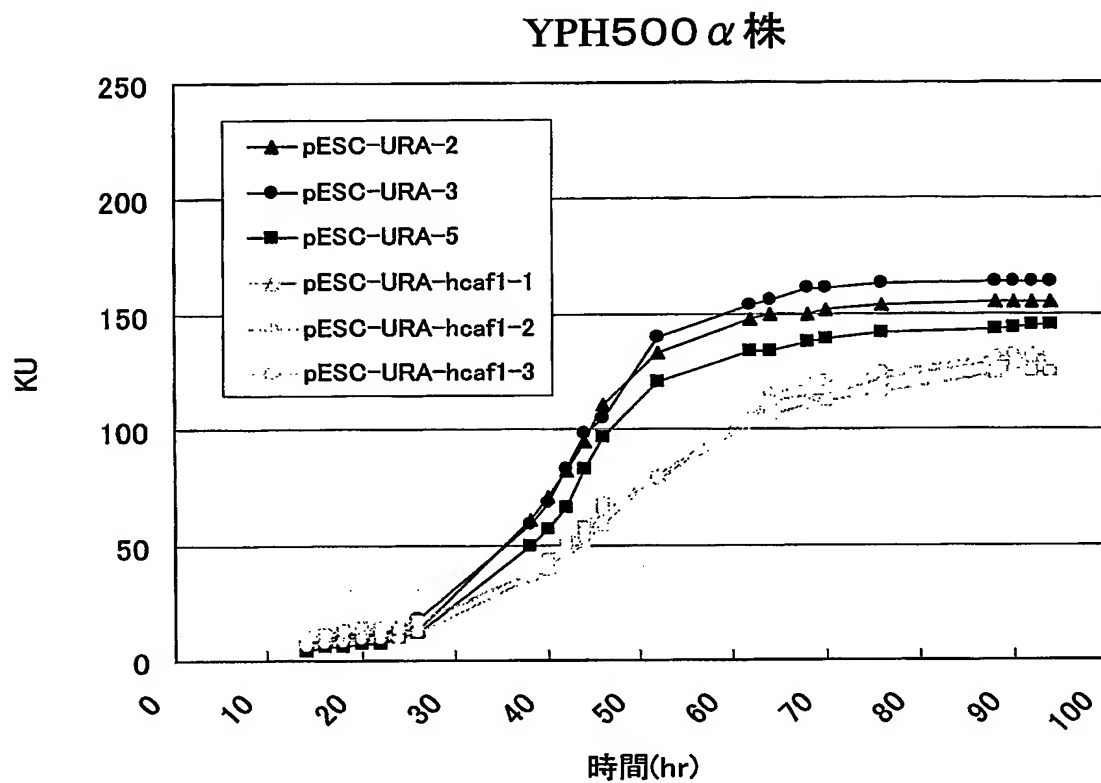
第8図



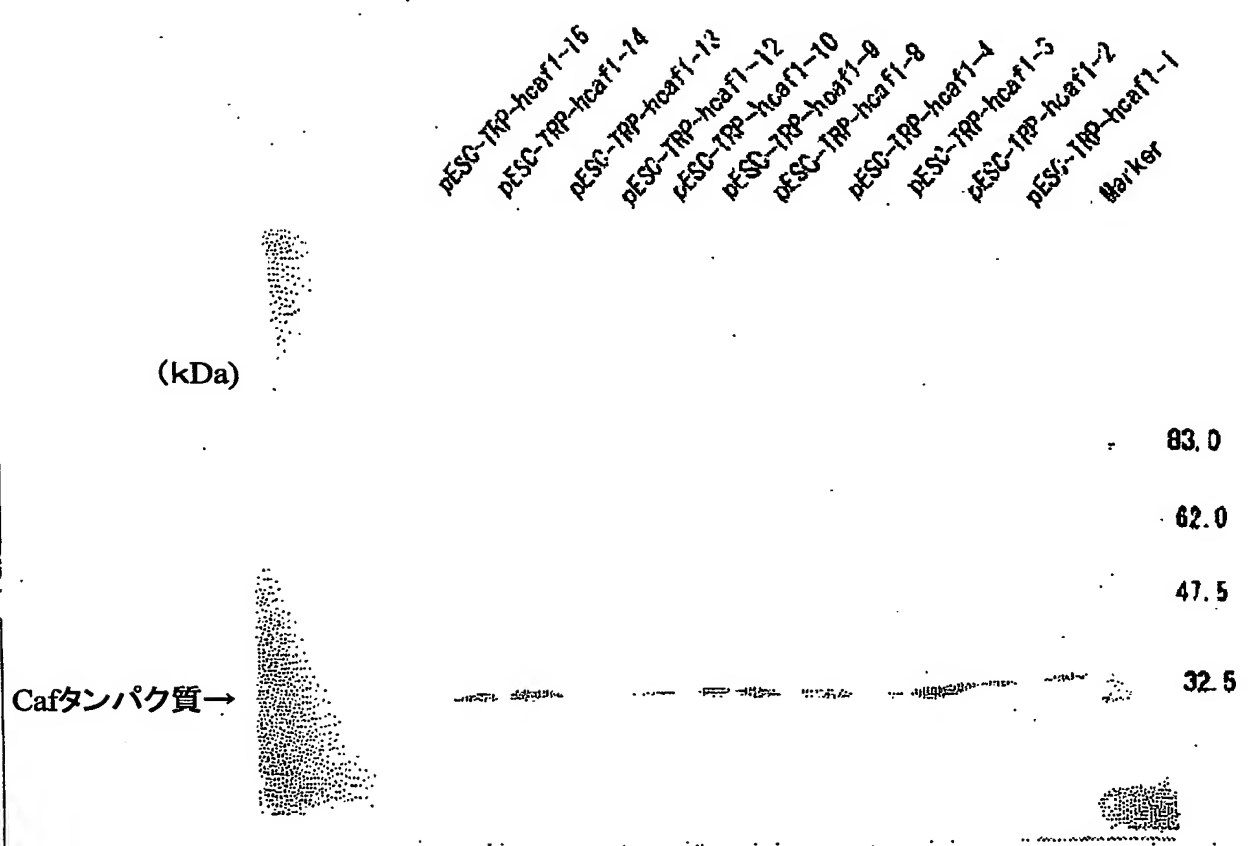
第9図



第10図



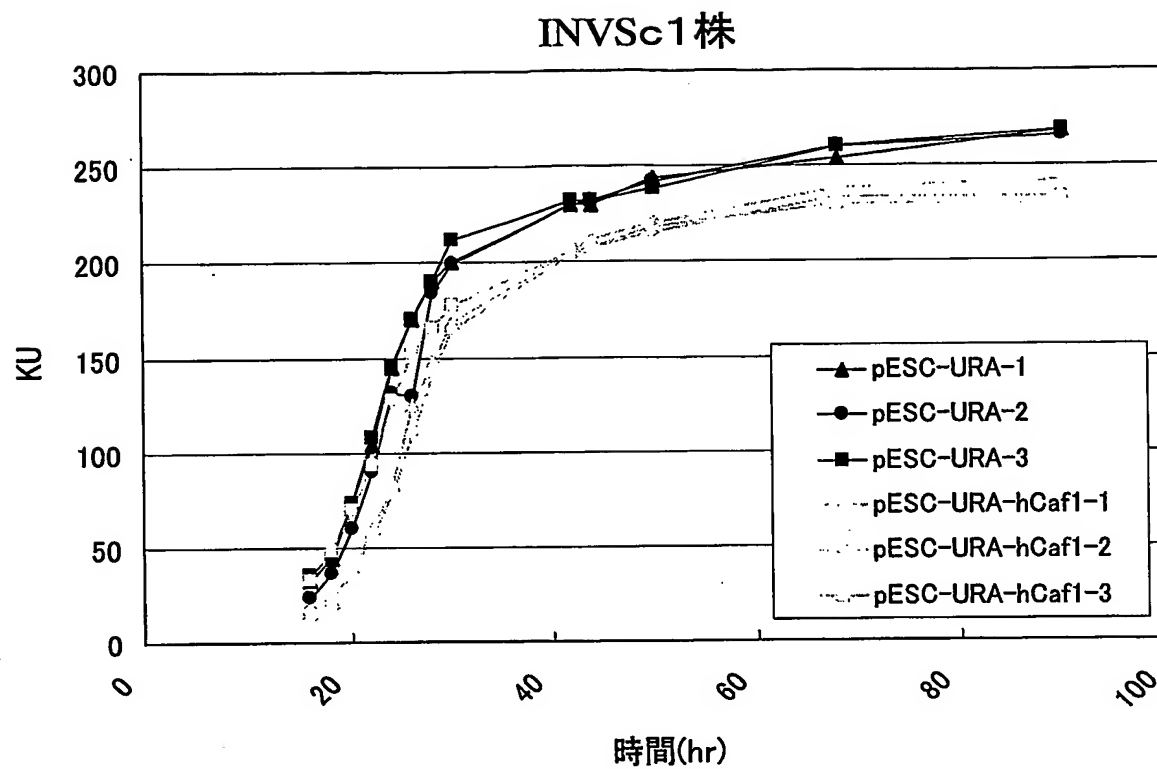
第11図



第12図

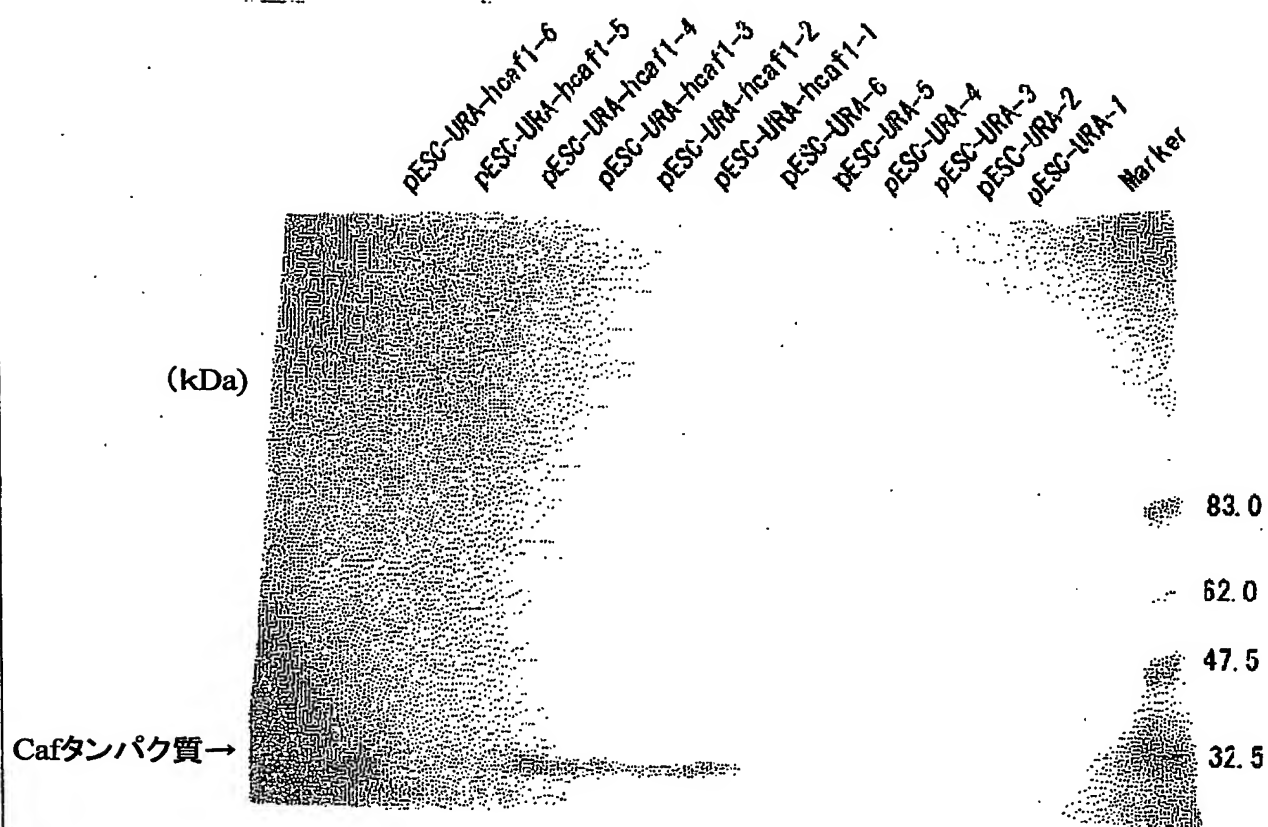
12/30

BEST AVAILABLE COPY

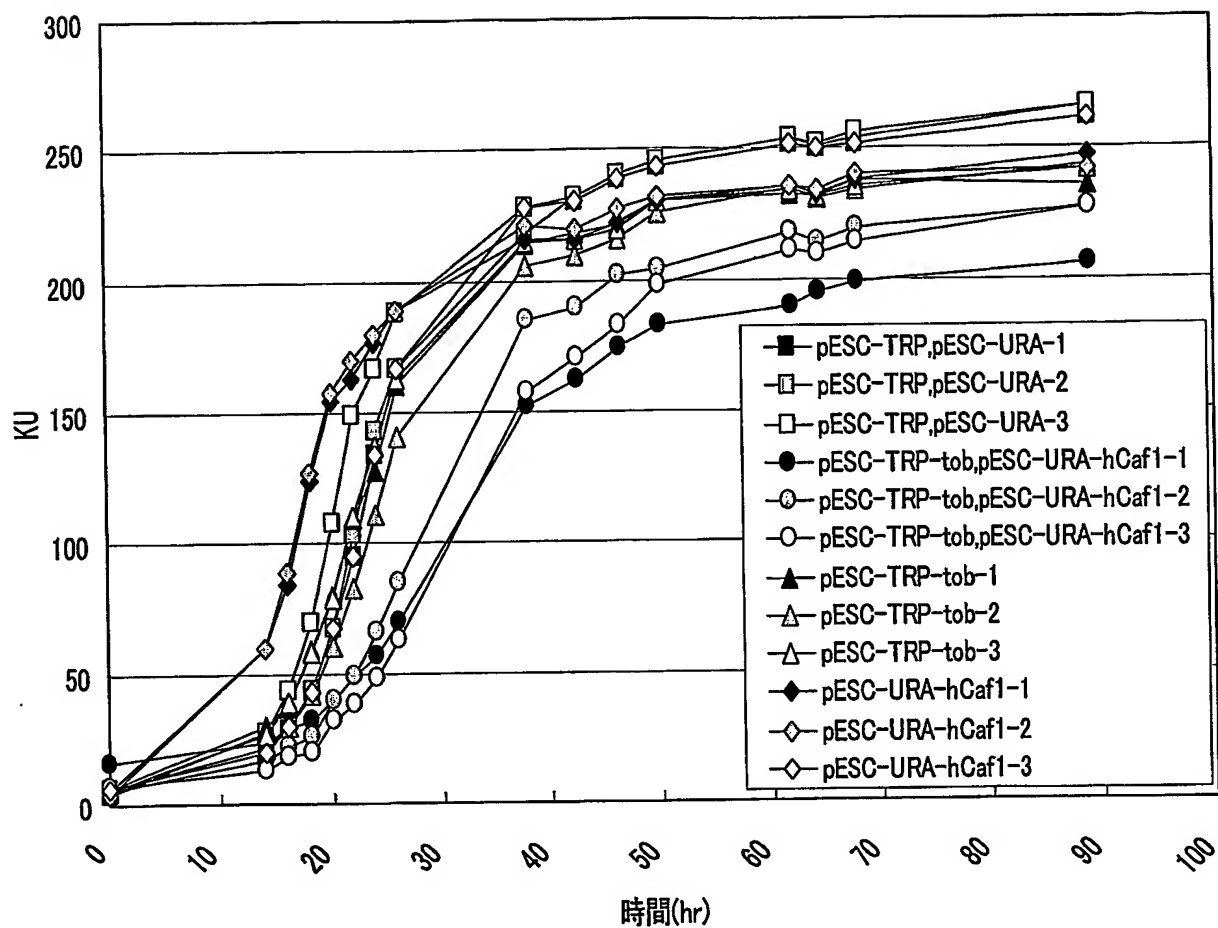


第13図

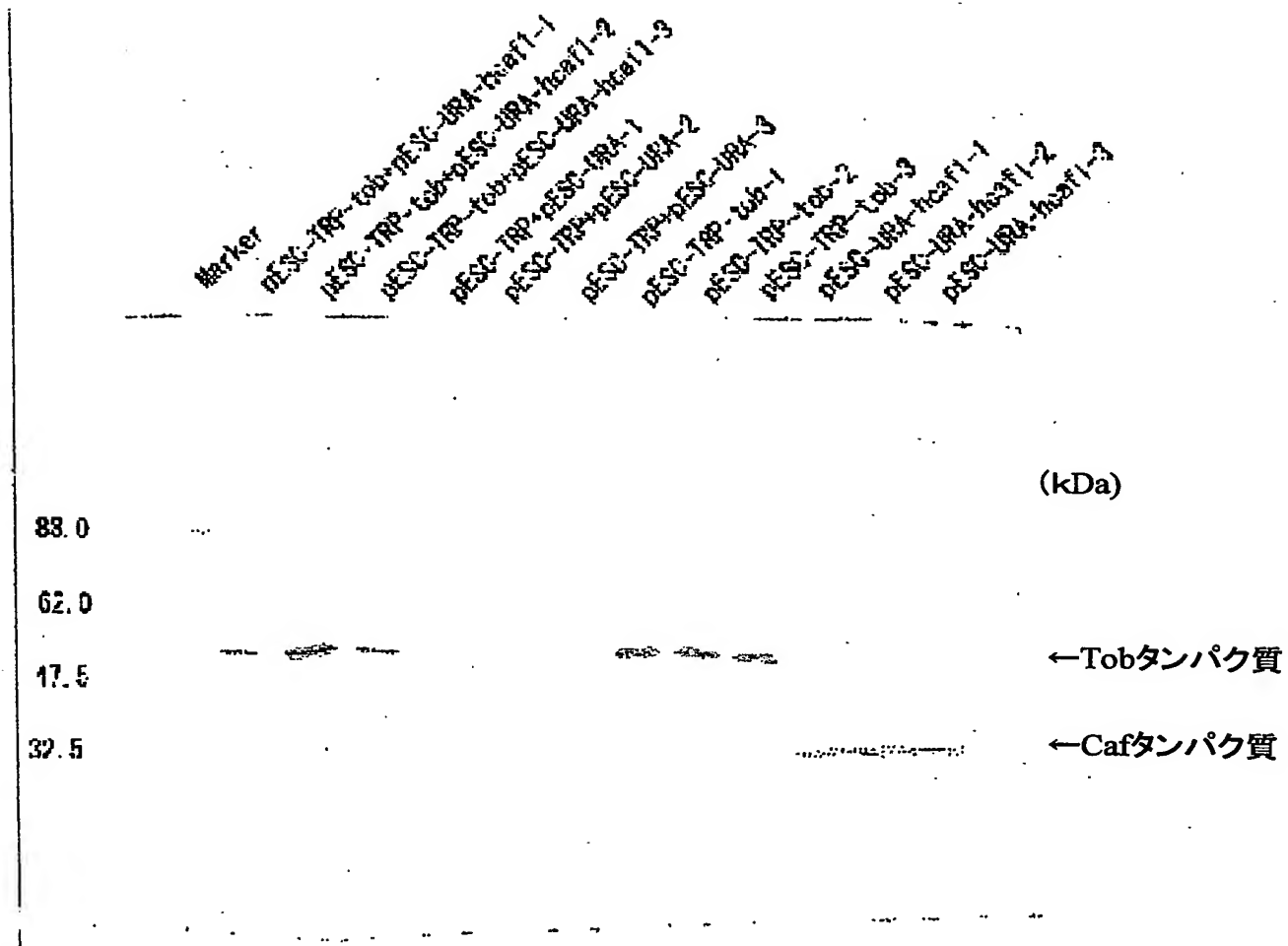
13/30



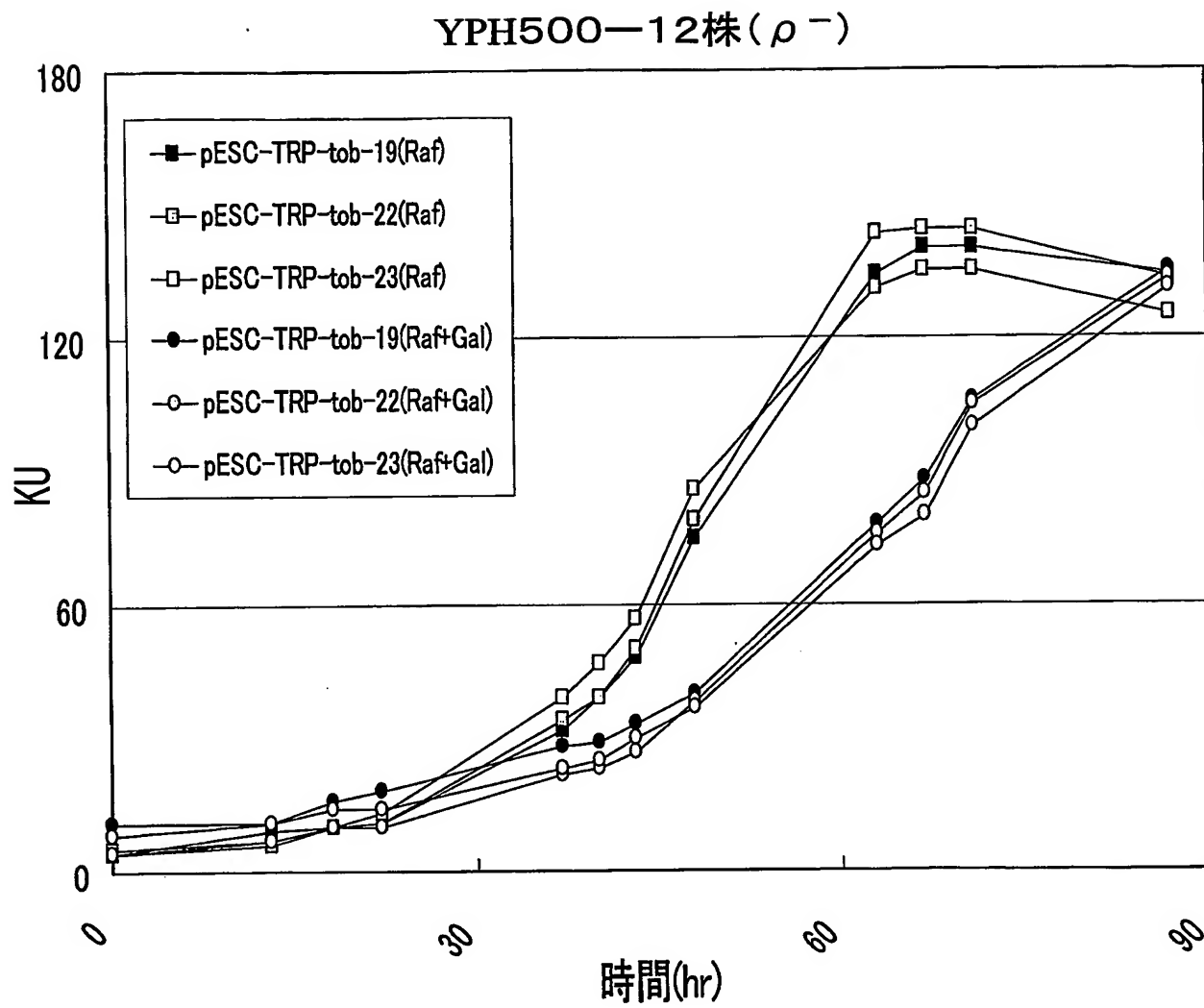
第14図



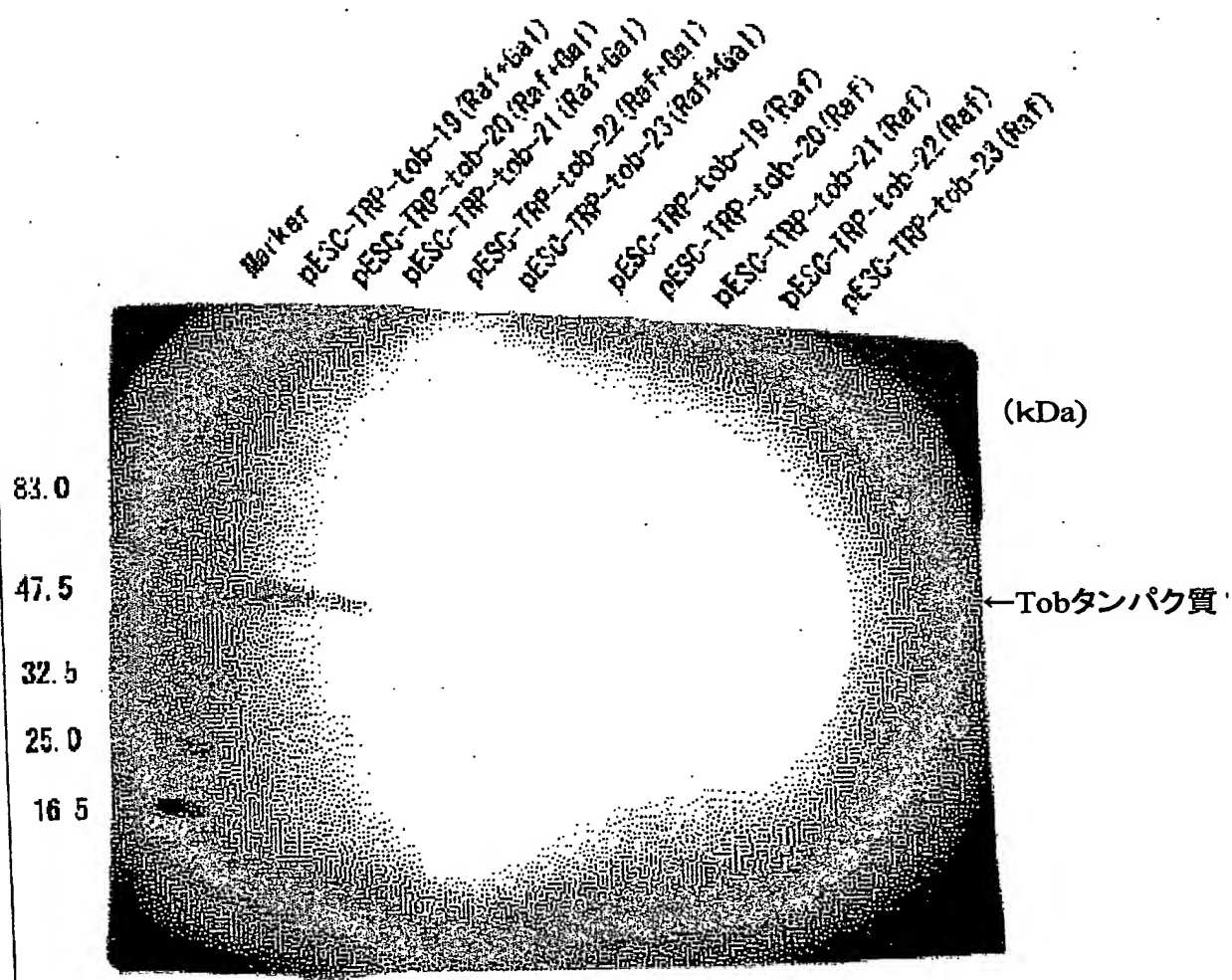
第15図



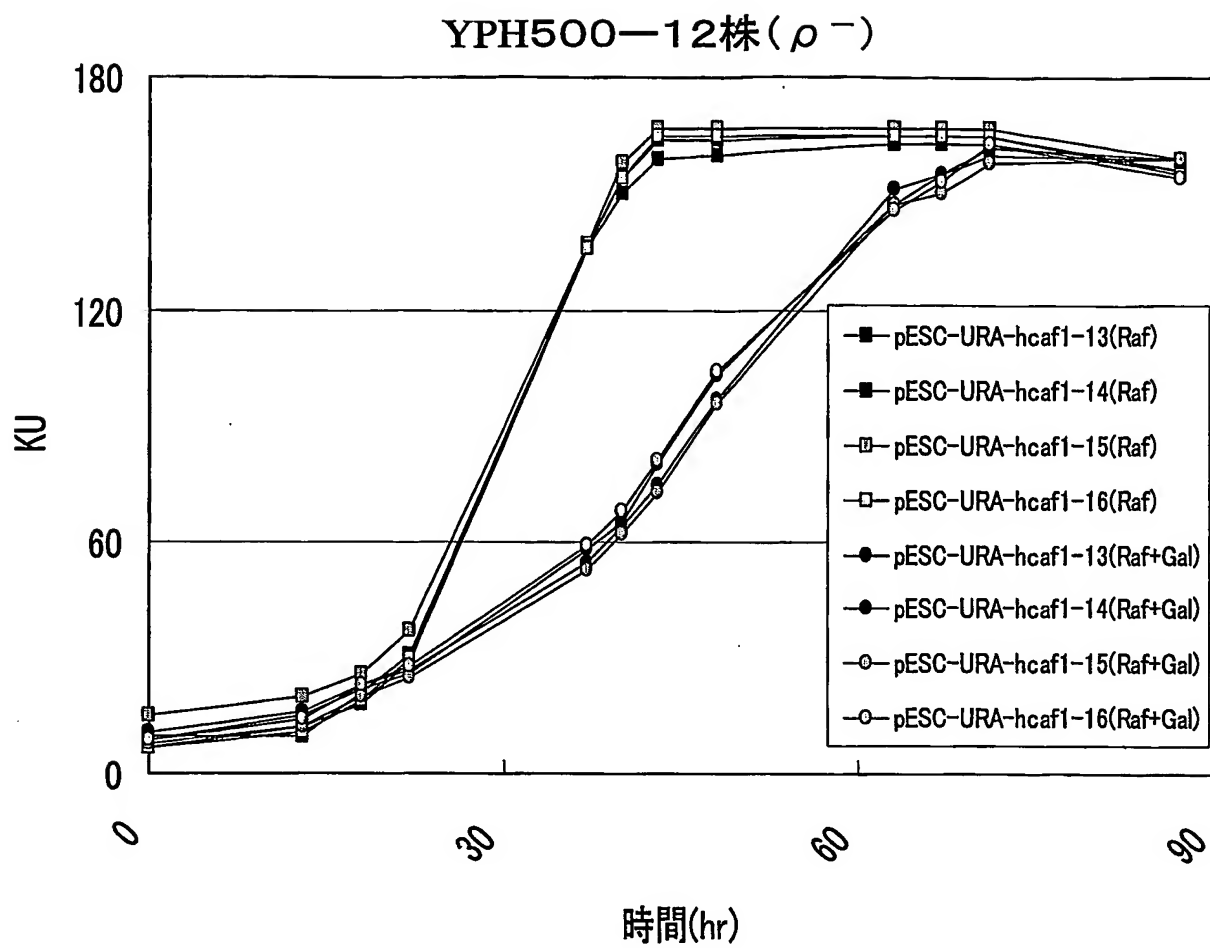
第16図



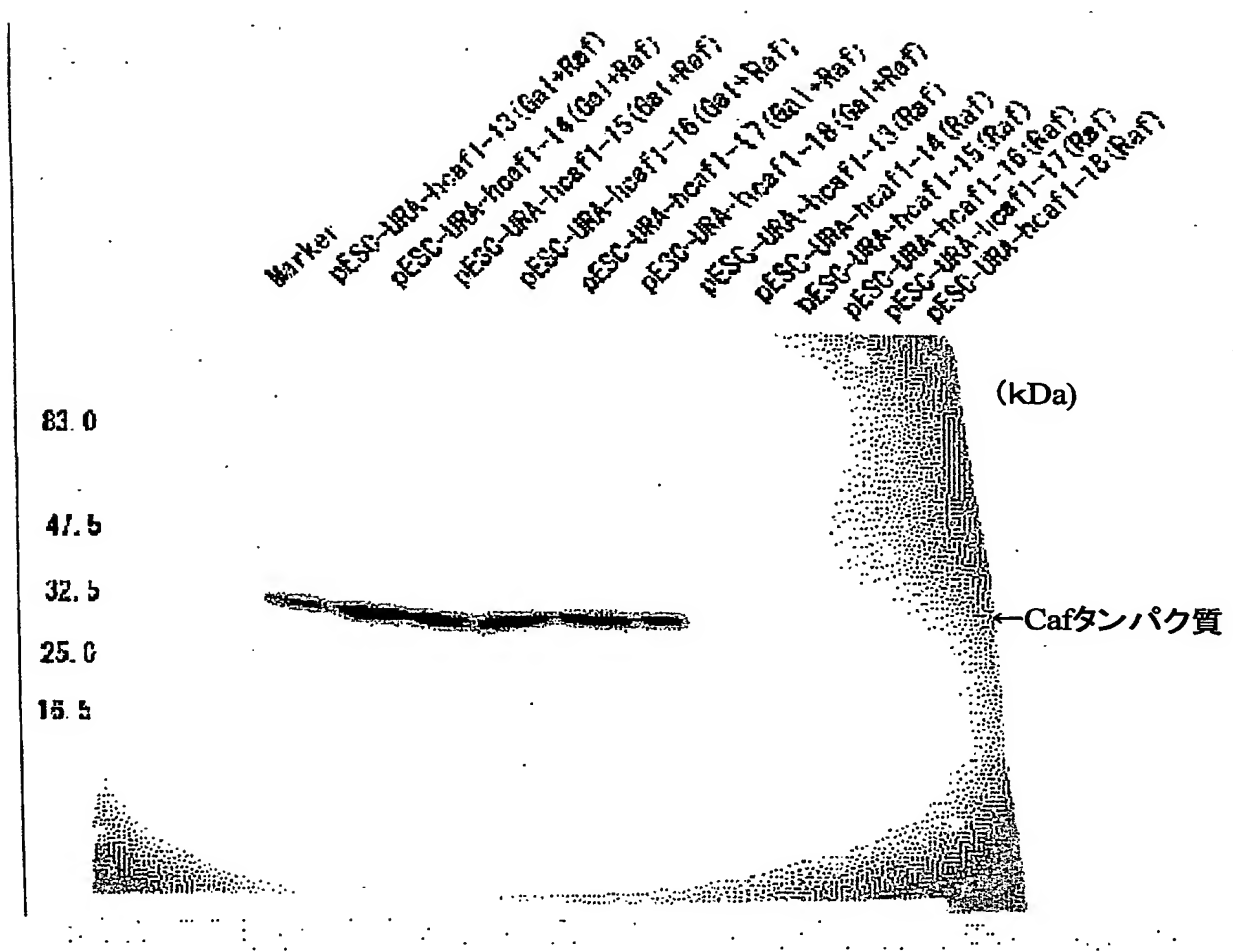
第17図



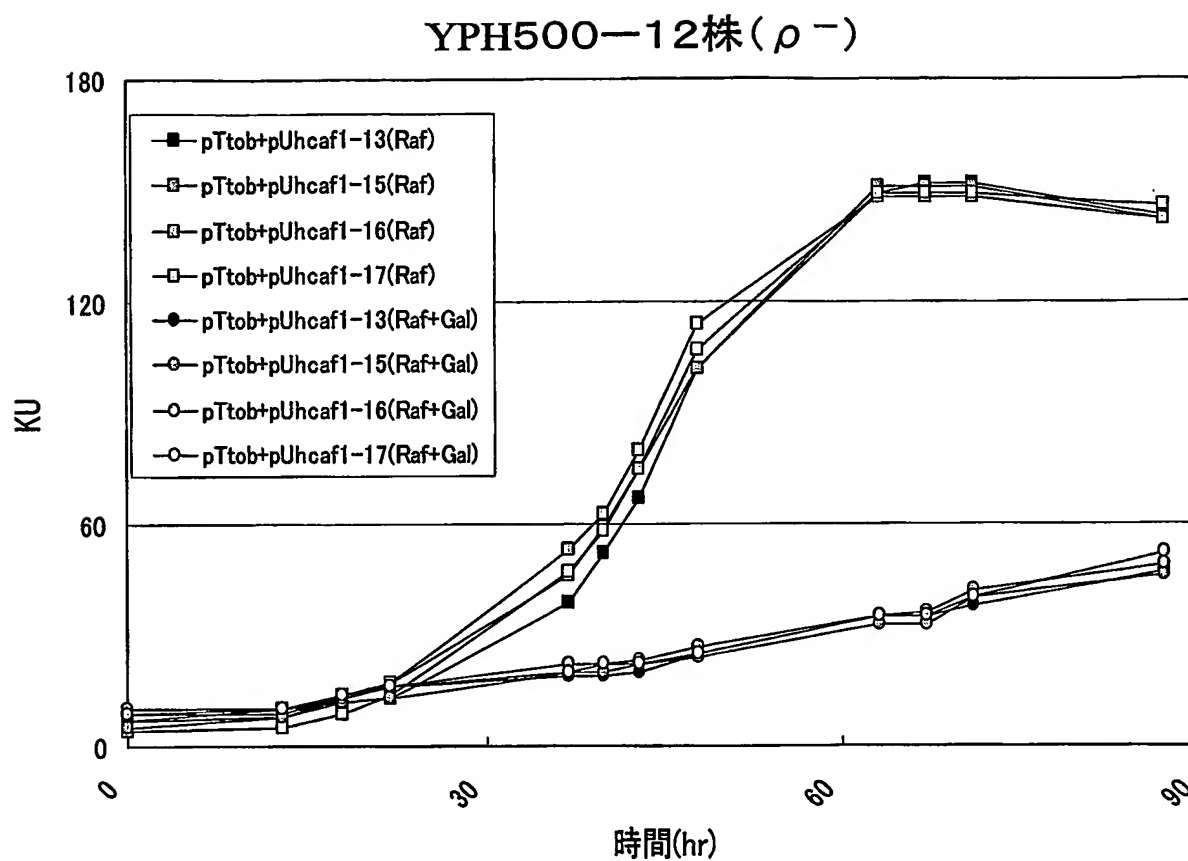
第18図



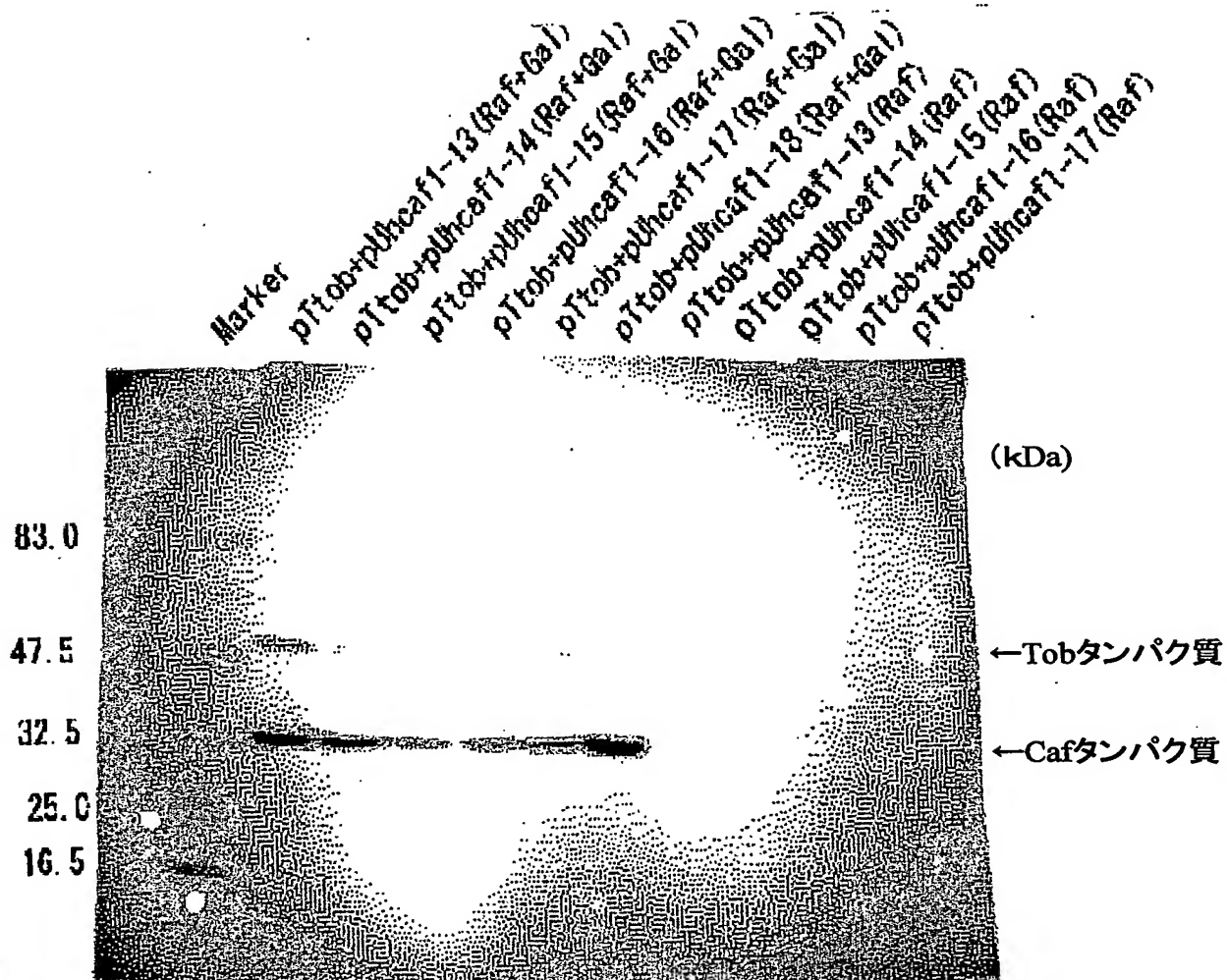
第19図



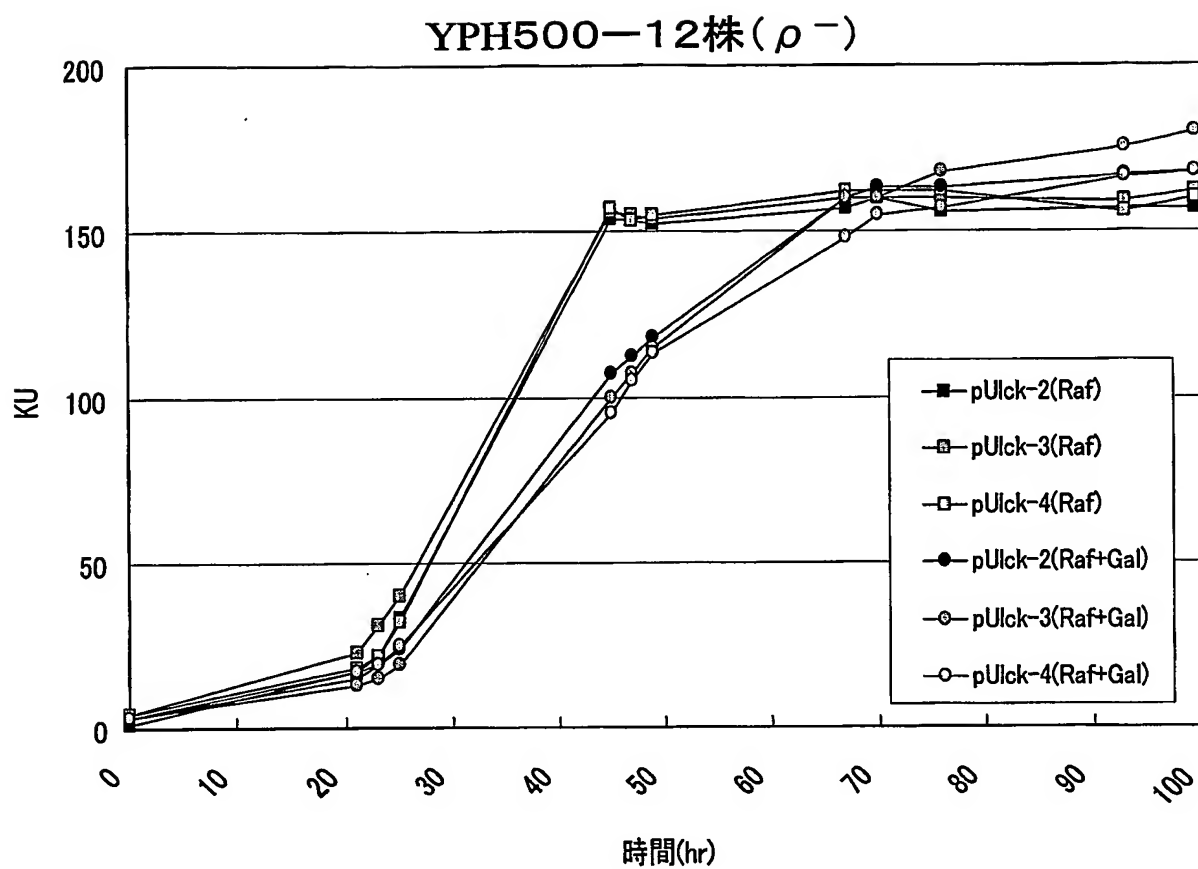
第20図



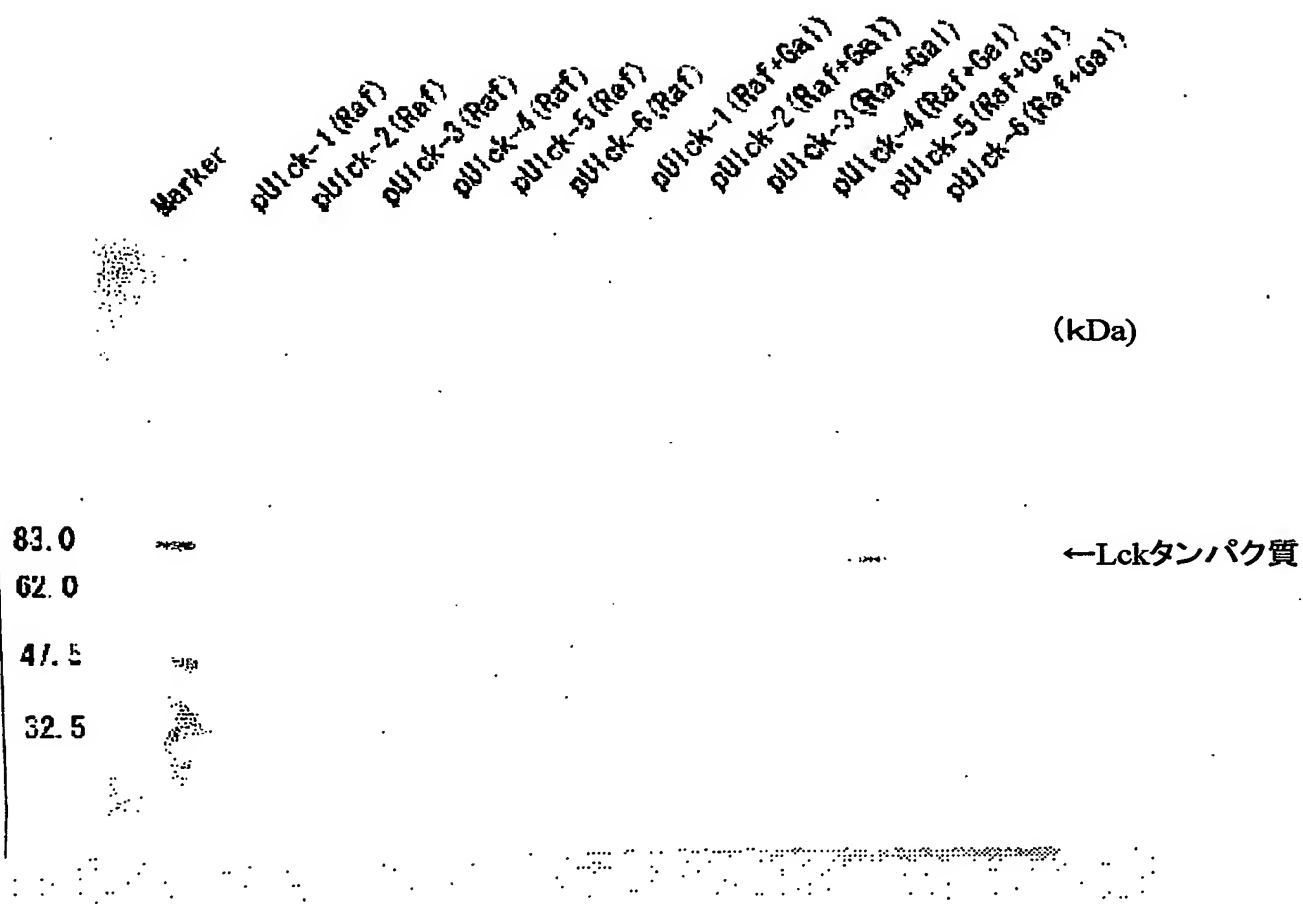
第21図



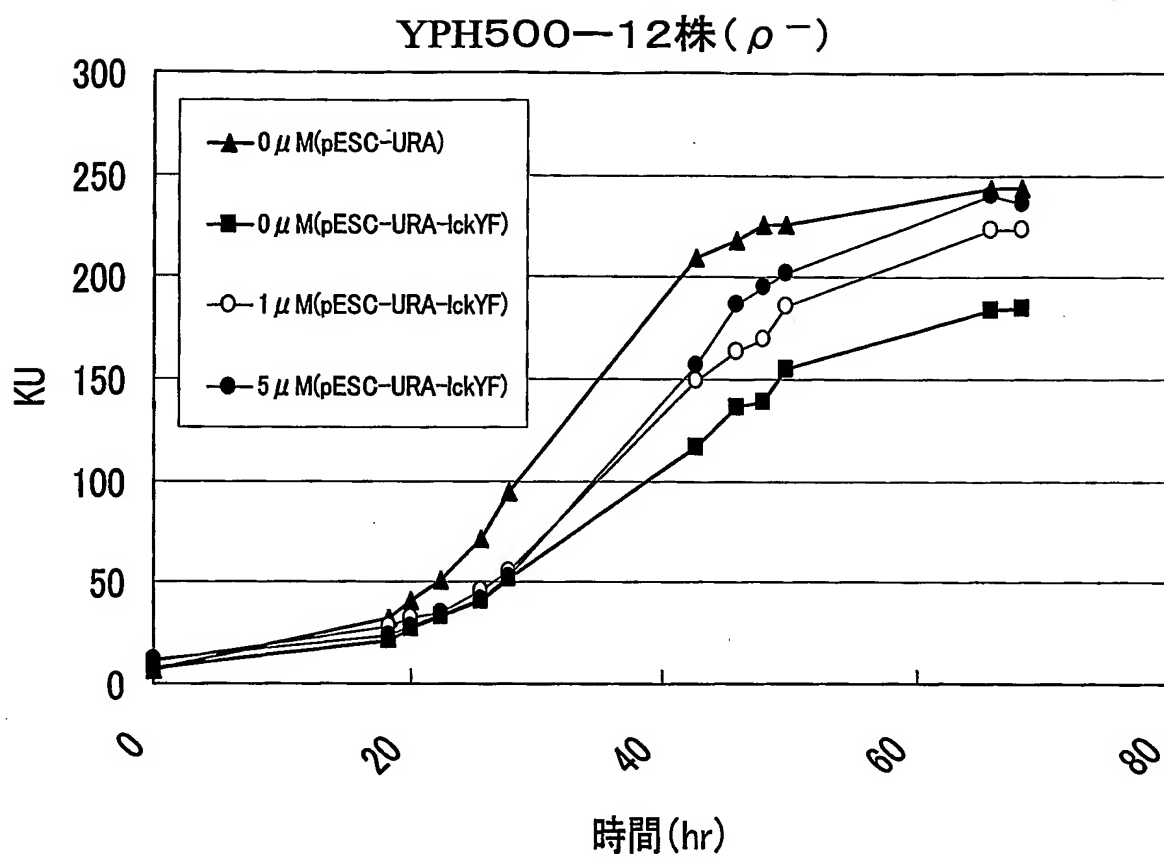
第22図



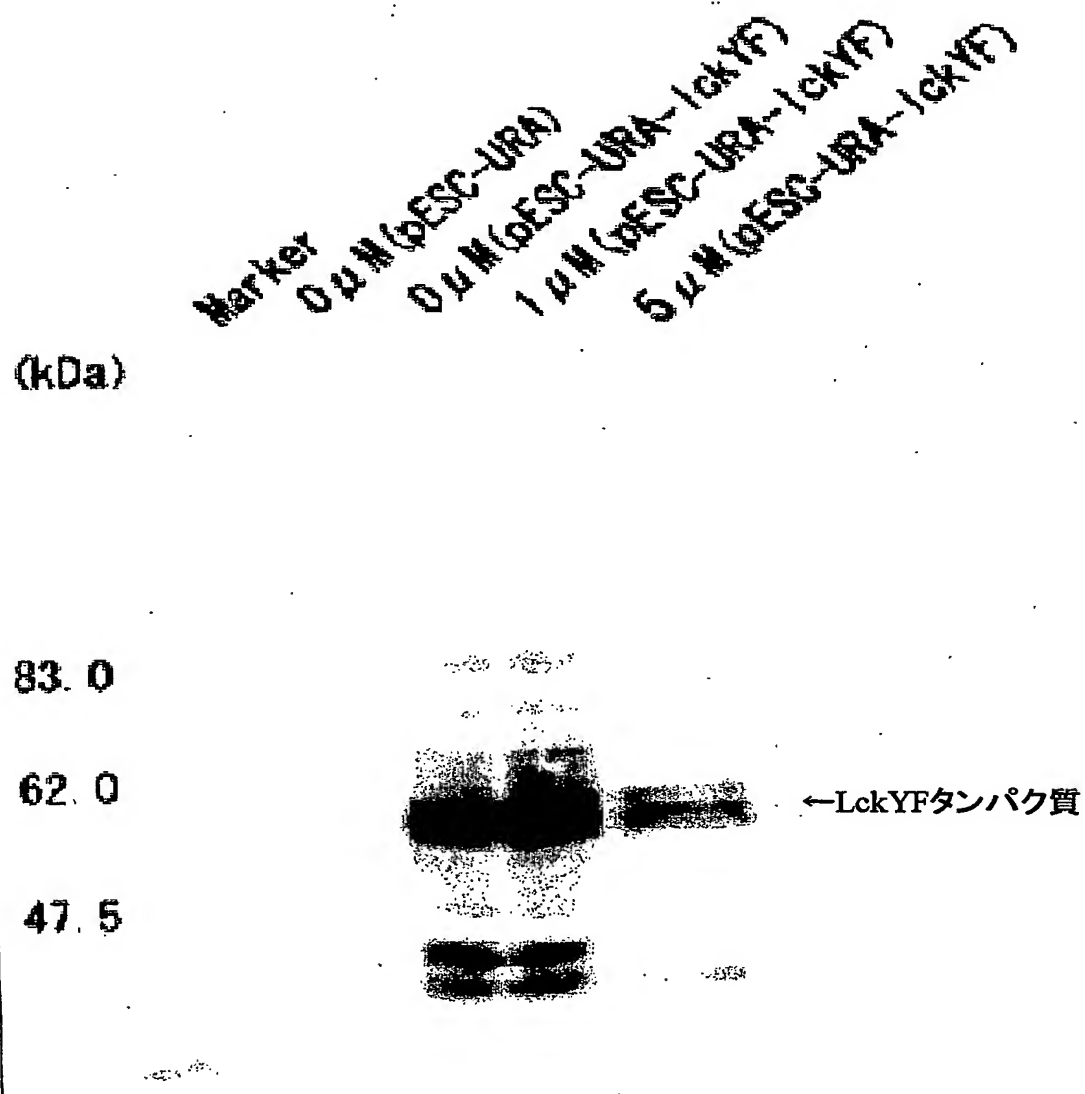
第23図



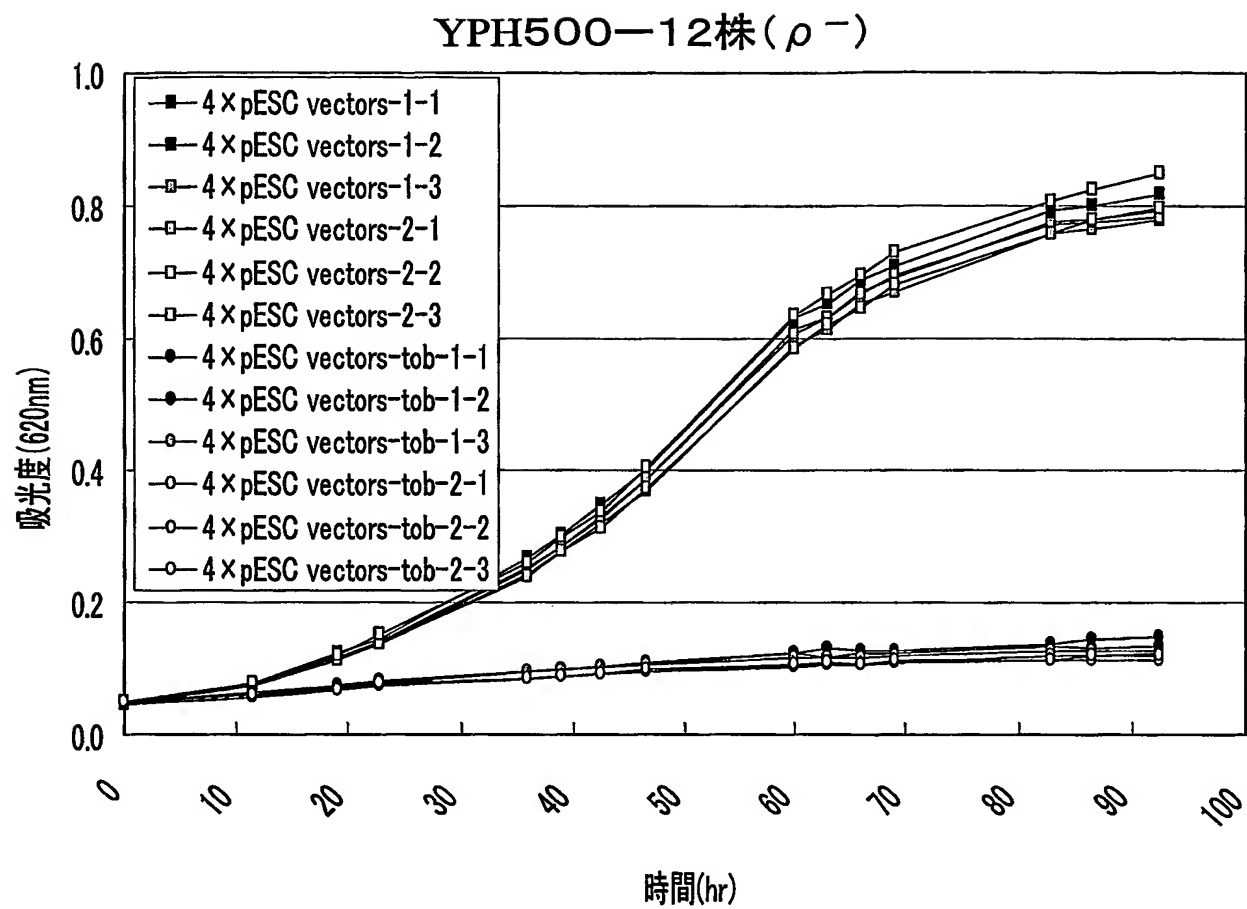
第24図



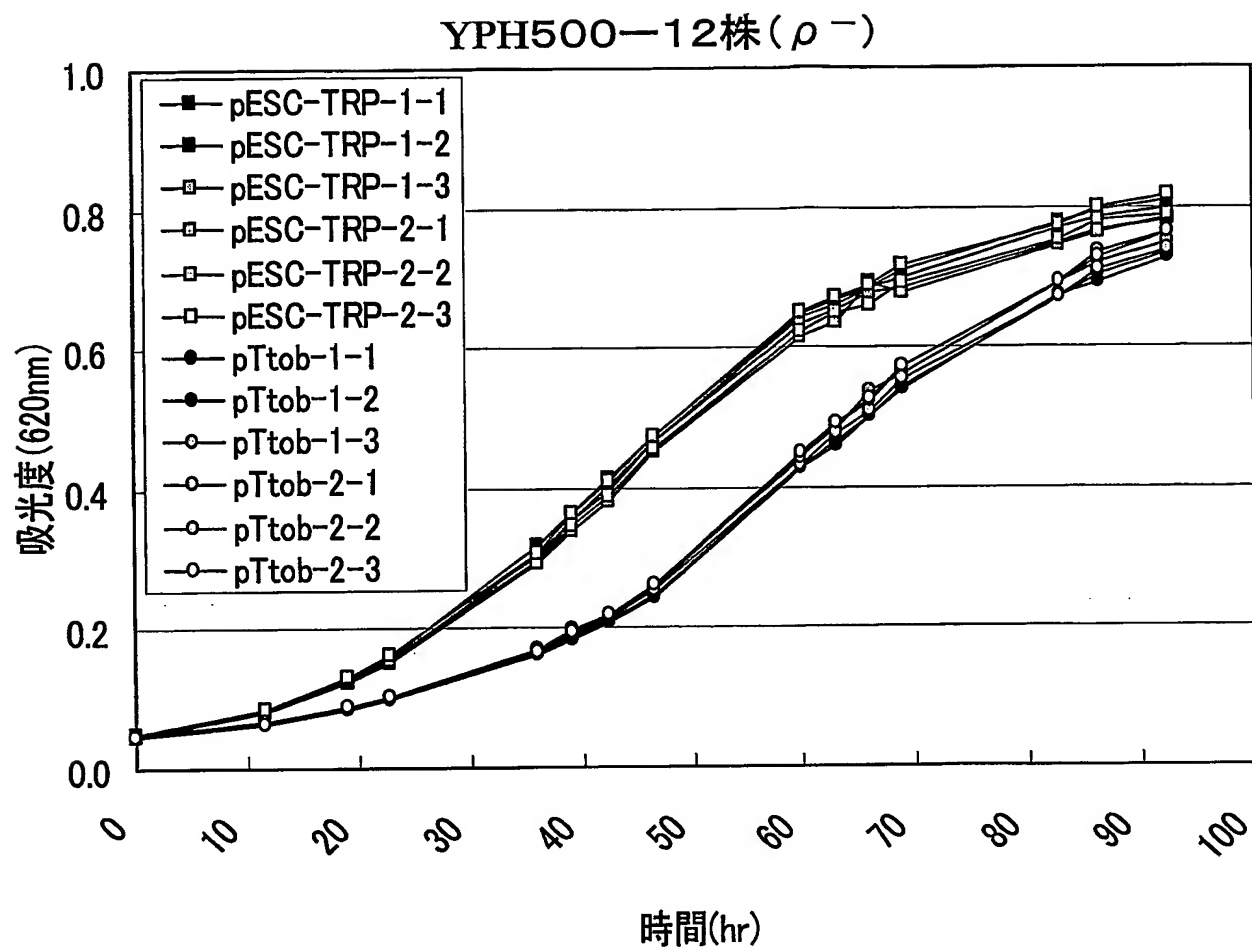
第25図



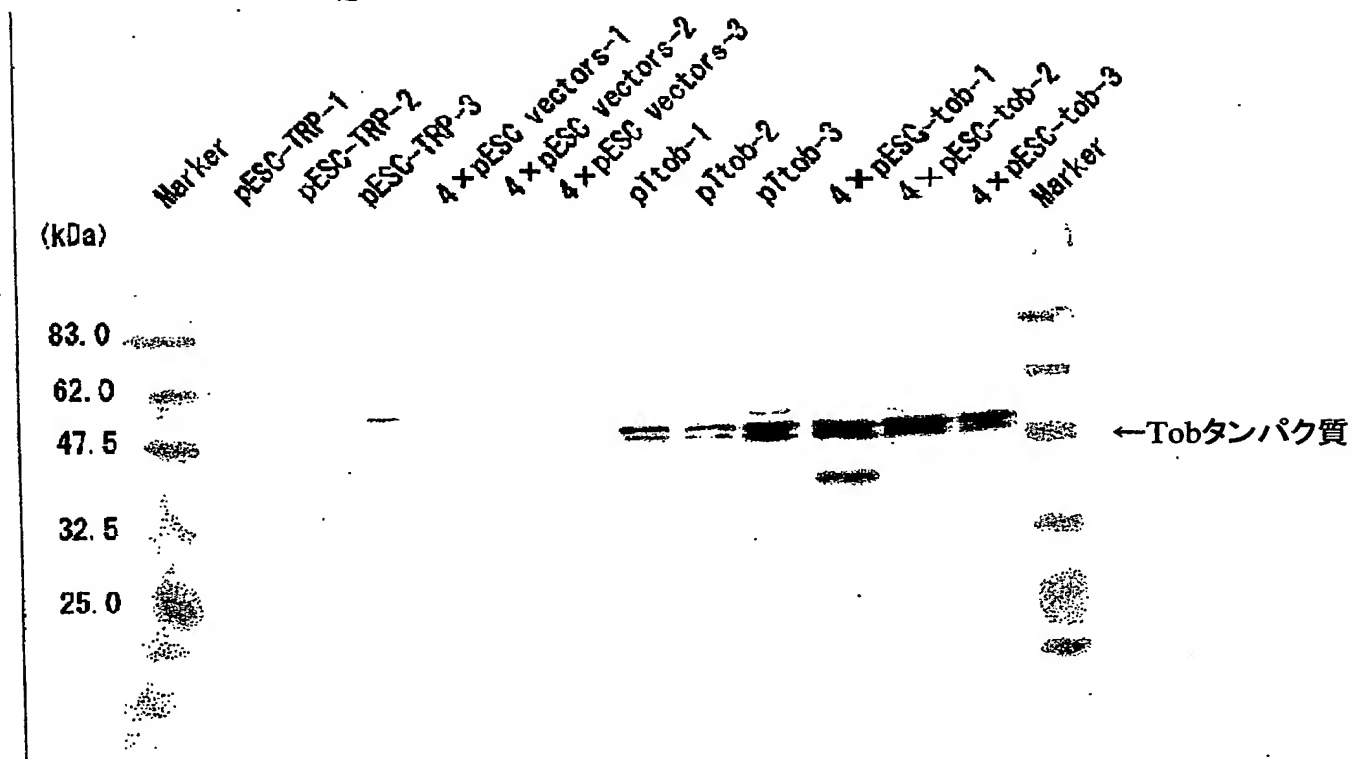
第26図



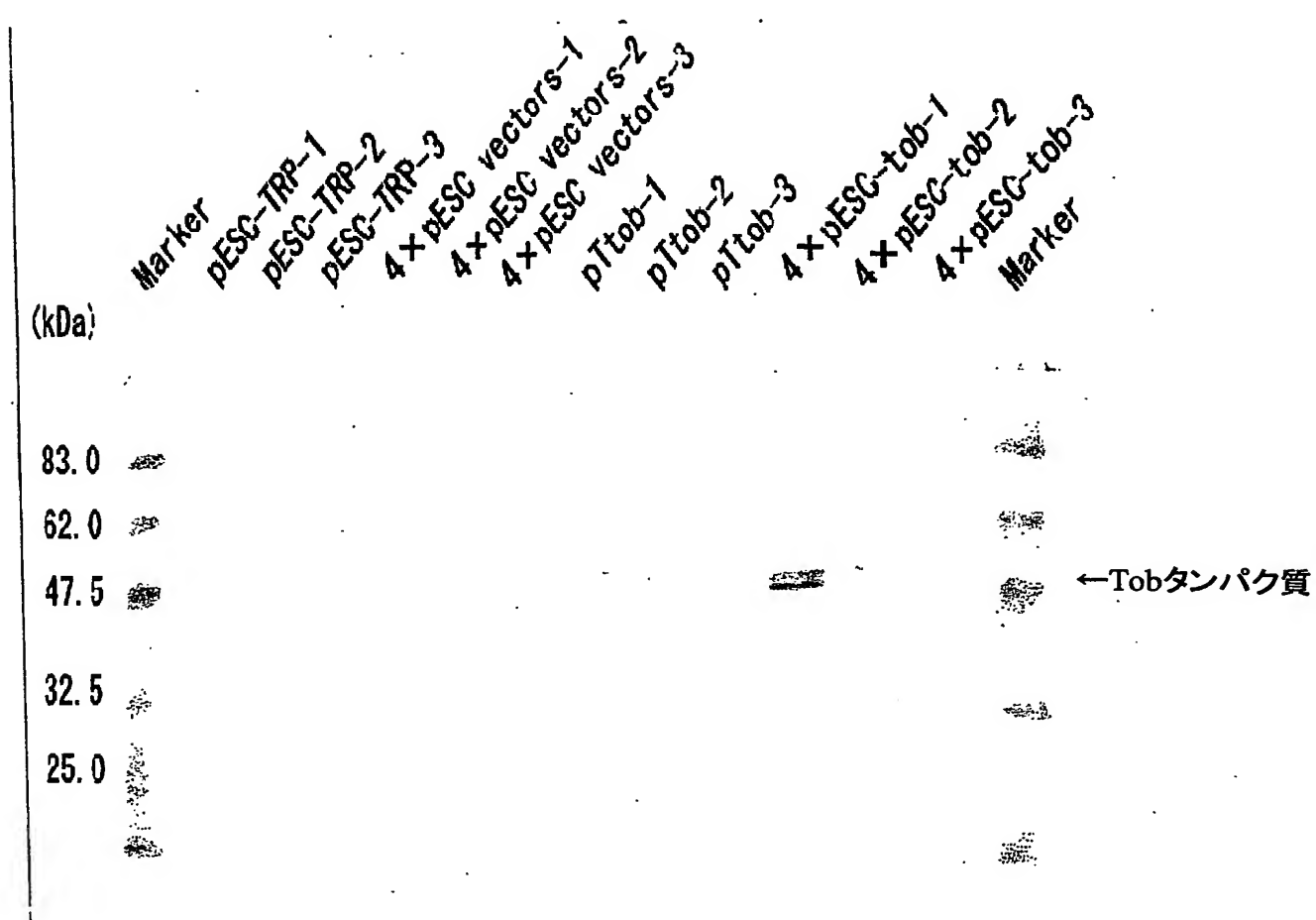
第27図



第28図



第29図



第30図

30/30

BEST AVAILABLE COPY

SEQUENCE LISTING

<110> Biochemical and Pharmacological Laboratories Inc.

<120> A screening method for physiologically active substance

<130> 03-061-PCT

<160> 9

<210> 1

<211> 138

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Gln Leu Glu Ile Gln Val Ala Leu Asn Phe Ile Ile Ser Tyr Leu
1 5 10 15

Tyr Asn Lys Leu Pro Arg Arg Arg Val Asn Ile Phe Gly Glu Glu Leu
20 25 30

Glu Arg Leu Leu Lys Lys Lys Tyr Glu Gly His Trp Tyr Pro Glu Lys
35 40 45

Pro Tyr Lys Gly Ser Gly Phe Arg Cys Ile His Ile Gly Glu Lys Val
50 55 60

Asp Pro Val Ile Glu Gln Ala Ser Lys Glu Ser Gly Leu Asp Ile Asp
65 70 75 80

Asp Val Arg Gly Asn Leu Pro Gln Asp Leu Ser Val Trp Ile Asp Pro
85 90 95

Phe Glu Val Ser Tyr Gln Ile Gly Glu Lys Gly Pro Val Lys Val Leu
100 105 110

Tyr Val Asp Asp Asn Asn Glu Asn Gly Cys Glu Leu Asp Lys Glu Ile
115 120 125

Lys Asn Ser Phe Asn Pro Glu Ala Gln Val
130 135

<210> 2

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Tyr Glu Gly His Trp Tyr Pro Glu Lys Pro Tyr Lys Gly Ser Gly Phe
1 5 10 15

Arg Cys Ile

<210> 3

<211> 21

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Leu Pro Gln Asp Leu Ser Val Trp Ile Asp Pro Phe Glu Val Ser Tyr
1 5 10 15

Gln Ile Gly Glu Lys
20

<210> 4

<211> 285

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Pro Ala Glu Thr Val Asp His Ser Gln Arg Ile Cys Glu Val Trp
1 5 10 15

Ala Cys Asn Leu Asp Glu Glu Met Lys Lys Ile Arg Gln Val Ile Arg
20 25 30

Lys Tyr Asn Tyr Val Ala Met Asp Thr Glu Phe Pro Gly Val Val Ala
35 40 45

Arg Pro Ile Gly Glu Phe Arg Ser Asn Ala Asp Tyr Gln Tyr Gln Leu
50 55 60

Leu Arg Cys Asn Val Asp Leu Leu Lys Ile Ile Gln Leu Gly Leu Thr
65 70 75 80

Phe Met Asn Glu Gln Gly Glu Tyr Pro Pro Gly Thr Ser Thr Trp Gln

85 90 95
Phe Asn Phe Lys Phe Asn Leu Thr Glu Asp Met Tyr Ala Gln Asp Ser
100 105 110
Ile Glu Leu Leu Thr Thr Ser Gly Ile Gln Phe Lys Lys His Glu Glu
115 120 125
Glu Gly Ile Glu Thr Gln Tyr Phe Ala Glu Leu Leu Met Thr Ser Gly
130 135 140
Val Val Leu Cys Glu Gly Val Lys Trp Leu Ser Phe His Ser Gly Tyr
145 150 155 160
Asp Phe Gly Tyr Leu Ile Lys Ile Leu Thr Asn Ser Asn Leu Pro Glu
165 170 175
Glu Glu Leu Asp Phe Phe Glu Ile Leu Arg Leu Phe Phe Pro Val Ile
180 185 190
Tyr Asp Val Lys Tyr Leu Met Lys Ser Cys Lys Asn Leu Lys Gly Gly
195 200 205
Leu Gln Glu Val Ala Glu Gln Leu Glu Leu Glu Arg Ile Gly Pro Gln
210 215 220
His Gln Ala Gly Ser Asp Ser Leu Leu Thr Gly Met Ala Phe Phe Lys
225 230 235 240
Met Arg Glu Met Phe Phe Glu Asp His Ile Asp Asp Ala Lys Tyr Cys
245 250 255
Gly His Leu Tyr Gly Leu Gly Ser Gly Ser Ser Tyr Val Gln Asn Gly
260 265 270
Thr Gly Asn Ala Tyr Glu Glu Glu Ala Asn Lys Gln Ser
275 280

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer to amplify *tob* gene

<400> 5

cccggatcca tgcagcttga aatccaagta

30

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer to amplify *tob* gene

<400> 6

cccgctgcagc ttagccataa caggctggaa

30

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer to amplify *lck* gene

<400> 7

atgggctgtg gctgcagctc a

21

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer to amplify *lck* gene

<400> 8

cccgtcgaca ggctgaggct ggtactggcc

30

<210> 9

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer to amplify *lckYF* gene

<400> 9

cccgtcgaca ggctgaggct gaaactggcc

30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/11329

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/09, C12Q1/02, C12N1/19

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/09, C12Q1/02, C12N1/19.

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS/WPI (DIALOG), MEDLINE (STN), JSTPlus/JST7580 (JOIS),
SwissProt/PIR/GeneSeq, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/ Y	SUPERTI-FURGA, G. et al., A functional screen in yeast for regulators and antagonizers of heterologous protein tyrosine kinases, Nat. Biotechnol., 1996, Vol.14, No.5, pages 600 to 605.	1-2, 5, 7-9, 15, 18/ 3-4, 6, 10-14, 16
Y	MATSUDA, S. et al., Tob, a novel protein that interacts with p185erbB2, is associated with anti-proliferative activity, Oncogene, 1996, Vol.12, No.4, pages 705 to 713	3-4, 10-14
Y	BOGDAN, J.A. et al., Human carbon catabolite repressor protein (CCR4)-associative factor 1: cloning, expression and characterization of its interaction with the B-cell translocation protein BTG1, Biochem.J., 1998, Vol.336, No.2, pages 471 to 481	3-4, 10-14

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
08 October 2003 (08.10.03)

Date of mailing of the international search report
21 October, '2003 (21.10.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/11329

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SUZUKI, T. et al., Phosphorylation of three regulatory serines of Tob by Erk1 and Erk2 is required for Ras-mediated cell proliferation and transformation, Genes Dev, 2002 Jun., Vol.16, No.11, pages 1356 to 1370	3-4,10-14
Y	EP 317209 A2 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES LTD.), 24 May, 1989 (24.05.89), & JP 2-000418 A & CA 1312029 A & US 5182195 A	6,16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/11329

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 17

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Concerning the "physiologically active substance" in the above claim, no specific substance but a common screening method is presented in the description. Although the common technical knowledge at the point of the application is taken into consideration, it is (continued to extra sheet)

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/11329

Continuation of Box No.I-2 of continuation of first sheet(1)

completely unknown what specific substances are involved in the scope thereof. Thus, the above claim is described in an unclear manner and no meaningful international search can be made thereon.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl. ⁷ C12N15/09, C12Q1/02, C12N1/19

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl. ⁷ C12N15/09, C12Q1/02, C12N1/19

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
BIOSIS/WPI (DIALOG), MEDLINE (STN), JSTPlus/JST7580 (JOIS),
SwissProt/PIR/GeneSeq, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y	SUPERTI-FURGA, G. et al., A functional screen in yeast for regulators and antagonizers of heterologous protein tyrosine kinases, Nat Biotechnol, 1996, Vol. 14, No. 5, pp. 600-605	1-2, 5, 7-9, 15, 18/ 3-4, 6, 10-14, 16
Y	MATSUDA, S. et al., Tob, a novel protein that interacts with p185erbB2, is associated with anti-proliferative activity, Oncogene, 1996, Vol. 12, No. 4, pp. 705-713	3-4, 10-14

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日
08. 10. 03

国際調査報告の発送日
21.10.03

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
七條 里美
電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	BOGDAN, J. A. et al., Human carbon catabolite repressor protein (CCR4)-associative factor 1: cloning, expression and characterization of its interaction with the B-cell translocation protein BTG1, Biochem J, 1998, Vol.336, No.2, pp.471-481	3-4, 10-14
Y	SUZUKI, T. et al., Phosphorylation of three regulatory serines of Tob by Erk1 and Erk2 is required for Ras-mediated cell proliferation and transformation, Genes Dev, 2002 Jun, Vol.16, No.11, pp.1356-1370	3-4, 10-14
Y	EP 317209 A2 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES LTD) 1989.05.24 & JP 2-000418 A & CA 1312029 A & US 5182195 A	6, 16

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☒ 請求の範囲 17 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
前記請求の範囲の「生理活性物質」について、明細書には、一般的なスクリーニング方法が記載されているのみであり、具体的な物質については何ら記載されていない。また、出願時の技術常識を勘案しても具体的にどのようなものが包含されるのか全く不明である。したがって、前記請求の範囲の記載は不明確であり、有意義な国際調査をすることができない。
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。